



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**RICERCA IN VITRO DI BIOMARCATORI TUMORALI PAROTIDEI
SU ESTRATTI PROTEICI DA TESSUTO PARAFFINATO**

Relatore:

Prof. Gino Giannaccini

Prof. Antonio Lucacchini

Correlatore:

Dott.ssa Laura Giusti

Candidata:

Jonida Batalli

Anno accademico

2014/2015

*Ai miei genitori
e a mio fratello!*

INDICE

Capitolo 1 – INTRODUZIONE..... 5

1.1 Tumori delle ghiandole salivari

1.1.1 Cenni di anatomia e fisiologia delle ghiandole salivari.....6

1.1.2 Epidemiologia e fattori di rischio.....11

1.2 Tumori maligni della ghiandola parotidea

1.2.1 Classificazione istologica.....14

1.2.2 Diagnosi.....17

1.2.3 Terapia.....19

1.3 Tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE)

1.3.1 Scopo della fissazione ed inclusione di un campione biologico...20

1.3.2 Prelievo dei campioni.....21

1.3.3 Tecnica di fissazione in formalina.....22

1.3.4 Tecnica di Inclusione in paraffina.....24

1.4 Proteomica.....25

1.4.1 SDS-PAGE.....27

1.5 Studi proteomici dei tessuti FFPE.....29

1.5.1 Deparaffinizzazione ed estrazione proteica.....30

1.5.2 Caratterizzazione proteomica degli estratti da tessuto FFPE..... 32

Capitolo 2 - SCOPO DELLA TESI.....34

Capitolo 3 - MATERIALI E METODI

3.1 Materiali e strumentazione.....36

3.2 Reclutamento dei campioni.....37

3.3 Preparazione dei campioni.....37

3.4 Deparaffinizzazione.....38

3.5 Estrazione proteica.....38

3.6 Dosaggio proteico RC/DC/BIORAD.....39

3.7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di

sodio- dodecil-solfatoSDS-PAGE)

3.7.1 Preparazione dei gel.....41

3.7.2 Caricamento dei campioni.....43

3.7.3 Corsa elettroforetica.....44

3.8 Western Blot

3.8.1 Trasferimento dal gel alla nitrocellulosa.....44

3.8.2 Colorazione con rutenio.....46

3.8.3 Blocking.....46

3.8.4 Incubazione con anticorpo primario.....47

3.8.5 Incubazione con anticorpo secondario.....47

3.8.6 Rivelazione o “detection”48

Capitolo 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE.....50

BIBLIOGRAFIA.....59

CAPITOLO 1- INTRODUZIONE

La fissazione dei tessuti in formalina e l'inclusione in paraffina risulta la procedura più utilizzata per la conservazione dei campioni citologici, biotici e chirurgici poiché permette di mantenere le caratteristiche istologiche, citologiche e biologiche del tessuto archiviato a lungo termine (anni). I tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded) rappresentano una preziosa fonte d'informazione nel campo della caratterizzazione molecolare della malattia, sia per scopi diagnostici che terapeutici. L'utilizzo di tale tecnica conservativa per più di un secolo ha fatto sì che un numero incredibile di campioni di tessuto riguardanti varie malattie siano raccolti negli archivi di anatomia patologica di tutto il mondo. Questa elevata quantità di materiale biologico è considerata una risorsa preziosa per la ricerca poiché rende disponibili campioni di tessuto di malattie rare che possono essere impiegati per l'identificazione di nuovi biomarcatori e lo sviluppo e validazione di test diagnostici.

L'utilizzo di campioni freschi è ovviamente preferibile per qualsiasi tecnica analitica ma spesso risulta difficile avere disponibilità di una rilevante quantità di tali tessuti. In questo lavoro di tesi abbiamo svolto degli studi di ricerca proteomica sulle neoplasie della ghiandola parotidea. La disponibilità

di questi tessuti è relativamente limitata data la bassa incidenza di queste lesioni tumorali e le ridotte dimensioni della ghiandola stessa perciò, i tessuti FFPE, abbondantemente presenti negli archivi, sono considerati una preziosa risorsa alternativa ai tessuti congelati freschi. Gli estratti di campioni FFPE possono essere una risorsa preziosa anche per la fase di validazione dei marcatori proteici, quando è richiesta una grande coorte di campioni e la scarsa disponibilità di tessuto congelato rende difficile effettuare ricerche statisticamente rilevanti.

1.1 TUMORI DELLE GHIANDOLE SALIVARI

1.1.1 Cenni di anatomia e fisiologia delle ghiandole salivari

Le ghiandole salivari sono organi esocrini responsabili della produzione e secrezione della saliva; sono costituite da tre ghiandole maggiori (fig.1), quali la parotide, la sottomandibolare e la sottomandibolare, e da ghiandole minori. Queste ultime sono numerose e distribuite ampiamente a livello del cavo orale, dell'orofaringe e delle vie aeree superiori [1].

L'unità funzionale delle ghiandole salivari è costituita dall'acino, strutturalmente connesso con i dotti escretori, e dalle cellule mioepiteliali. I suddetti acini possono essere sierosi, mucosi o misti. La secrezione principale è costituita da amilasi per quanto riguarda le cellule a secrezione sierosa e sialomucina per le cellule a secrezione mucosa [1][34].

La ghiandola parotidea è la maggiore: pesa circa 30 g, presenta una forma irregolare e lobulata, composta da tante piccole e circoscritte aree parenchimali, i lobuli, e da unità secernenti di forma sferoidale, gli acini, e da un sistema di dotti escretori, i tubuli; è di colore giallo-grigiastro.

E' situata nella loggia parotidea del collo, uno spazio dietro il ramo della mandibola, davanti al muscolo sternocleidomastoideo e sotto il meato acustico esterno, nonché lateralmente allo spazio faringeo [35].

La loggia che la raccoglie è rivestita da una capsula composta da una lamina fibrosa strettamente aderente alla superficie ghiandolare. Presenta un corpo di forma prismatico-triangolare e contiene in prevalenza ghiandole sierose che producono la saliva sierosa.

Il suo condotto escretore (dotto di Stenone), lungo circa 4-5 cm, emerge dal margine anteriore della ghiandola, attraversa il muscolo buccinatore e si apre nel vestibolo della bocca all'altezza del secondo dente molare superiore. Si reperta abbondante tessuto adiposo sia intralobulare che extralobulare che tende ad aumentare con l'età. All'interno della ghiandola si repertano strutture linfoidi e linfonodi, che a loro volta possono contenere dotti salivari ed acini. I suoi acini sono composti da due tipi di cellule secretrici: le cellule chiare, ricche di reticolo ergastoplasmatico con granuli nel segmento apicale, ed alcune cellule scure anch'esse ricche di ergastoplasma [1], [34], [35].

E' l'unica ghiandola salivare nel cui contesto si ritrovano adipociti, in rapporto 1:1 rispetto agli elementi acinici ghiandolari.

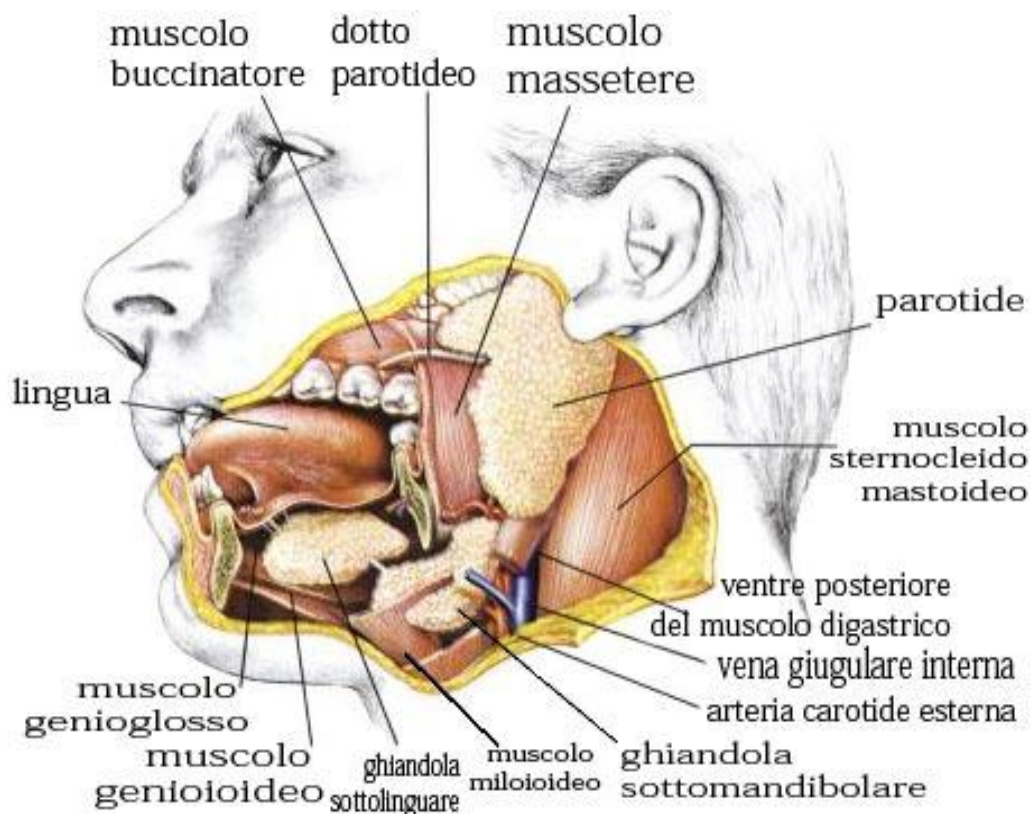
Le cellule mioepiteliali, così definite perché nel loro citoplasma si ritrovano fibrille mioidi, sono elementi particolari localizzati tra le cellule acinari e la membrana basale: grazie alla loro capacità contrattile favoriscono l'escrezione salivare e garantiscono il ricambio sia delle cellule acinari che di quelle duttali [36].

La ghiandola sottomandibolare è a secrezione mista siero-mucinoso, sebbene la porzione sierosa sia predominante. Negli acini a secrezione mista,

la componente sierosa si dispone a formare un cappuccio al di fuori della componente mucinosa. I dotti intercalari sono più corti e i dotti striati sono più rappresentati rispetto alla ghiandola parotide [35], [36].

La ghiandola sottomandibolare è a secrezione mista sieromucinoso con prevalenza della secrezione mucosa.

Ghiandole salivari minori. L'area a maggiore concentrazione di questo tipo di ghiandole è a livello della giunzione tra il palato duro e il palato molle, le labbra e la mucosa della bocca. Le ghiandole situate a livello della porzione laterale della lingua, delle labbra e della mucosa della bocca hanno secrezione sieromucinoso, mentre le ghiandole poste a livello della faccia ventrale della lingua, del palato, dell'area glossofaringea e retromorale, sono prevalentemente a secrezione mucosa [35], [36].



(fig.1) Ghiandole salivari maggiori

Il *nervo faciale*, motore, esce dal cranio attraverso il foro stilomastoideo, dietro la base dell'apofisi stiloide e si dirige verso la loggia parotidea con decorso obliquo in basso, in avanti e in fuori attraversando il diaframma stilieno. All'uscita da questo incrocia la faccia laterale del processo stiloide, affiancato all'arteria stilomastoidea, ponendosi come bisettrice tra osso timpanico e processo mastoideo [35].

Nel breve tragitto pre-parotideo il nervo emette dei rami collaterali, quindi penetra nella parotide e la attraversa orizzontalmente circa 2 cm sotto l'arcata zigomatica. In questo decorso il nervo, sempre collocato lateralmente alla carotide esterna e alla vena giugulare esterna, si avvicina alla superficie esterna della parotide e si divide in due rami, uno superiore e il temporo-facciale ed uno inferiore e cervico-facciale, che a loro volta si suddividono in ulteriori rami innervanti tutti i muscoli della faccia [35].

Oltre al nervo facciale la loggia parotidea è attraversata da diverse strutture anatomiche:

- arterie: tra le quali la più importante è la carotide esterna, che si divide in ulteriori rami terminali, la temporale superficiale e mascellare interna

- vene: la vena giugulare esterna è la principale vena della regione parotidea

- linfatici: la loggia parotidea contiene numerosi linfonodi tutti sottofasciali e distinti in linfonodi superficiali e linfonodi profondi

- nervi: quali il nervo auricolo-temporale, ramo del nervo mandibolare e il nervo grande auricolare [35].

Il parenchima ghiandolare è organizzato in unità semplici, gli acini, formati da cellule secretrici, da cellule totipotenti mioepiteliali e da un sistema duttale; quest'ultimo non partecipa alla funzione secretoria, ma gioca un ruolo di primaria importanza nella regolazione dell'acqua e degli

elettroliti. Il sistema duttale è formato da canalicoli intercalari in cui gli acini riversano il secreto primario salivare; a loro volta questi canalicoli convergono nei dotti striati ove si forma il secreto salivare vero e proprio, questi infine confluiscono in un unico dotto escretore [35].

La secrezione salivare non è omogenea, ma significativamente diversa a seconda della sede e della ghiandola che la produce.

La *saliva* è composta per il 99% da acqua con aggiunta di costituenti inorganici e organici ed i valori fisiologici del suo pH sono compresi in un ampio range tra 5.6 e 7.0. I costituenti inorganici comprendono prevalentemente ioni tra i quali sodio, potassio, calcio, magnesio, bicarbonato, fosfati; quello più rappresentato è il potassio presente in concentrazione sette volte superiore a quella del plasma, segue il bicarbonato con una concentrazione tre volte superiore a quella del plasma; hanno concentrazioni intermedie il calcio, il magnesio, i fosfati, mentre è caratteristicamente poco rappresentato il sodio, con una concentrazione di appena un decimo di quella plasmatica. Dei costituenti organici fanno parte le proteine (le immunoglobuline, gli enzimi, le mucine, ecc.), il glucosio e gli acidi grassi. Le glicoproteine ad alto peso molecolare come le IgA secretorie, le agglutinine, le amilasi, la cistatina S, le fosfoproteine e le proteine ad alto contenuto in prolina sono prodotte per lo più nelle ghiandole parotidi e sottomandibolari; diversamente le ghiandole sottolinguali e le salivari minori producono la quota più rilevante di mucine e sono anch'esse ricche di IgA secretorie [1], [34].

Il volume salivare medio secreto giornalmente si aggira intorno a 1.0- 1.5 litri, tuttavia la produzione di saliva è quantitativamente variabile: è modesta durante il sonno, aumenta nel parlare e ha la sua quota massima

in concomitanza dei pasti. Ogni variazione quantitativa è gestita e controllata dal sistema nervoso autonomo e prevalentemente dalla sua componente parasimpatica.

La saliva gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento di uno stato di eutrofismo del cavo orale e una serie di funzioni secondarie di umidificazione, gustative, difensive, digestive e tamponanti, oltre che microbiologiche e anticancerogeniche [1], [34].

1.1.2 Epidemiologia e fattori di rischio

Il tumore delle ghiandole salivari maggiori (*Major Salivary Gland Tumors-MSGT*) è piuttosto raro e rappresenta meno dell'1% di tutti i tumori umani e circa l'8% dei tumori testa-collo. Secondo le stime più recenti, in Italia è diagnosticato ogni anno un nuovo caso di tumore delle ghiandole salivari ogni 100.000 abitanti [24]. Considerando tutti gli istotipi neoplastici, la parotide risulta la sede di gran lunga più colpita e rappresenta circa l'80% delle localizzazioni dei MSGT; a seguire troviamo la ghiandola sottomandibolare e le ghiandole salivari accessorie (20%), mentre eccezionali sono le localizzazioni in sede sottolinguale ($\leq 1\%$). E' stato osservato che l'incidenza è molto più precoce nelle neoplasie benigne rispetto a quelle maligne: nelle prime abbiamo un picco d'incidenza tra 40 e 50 anni, le seconde sono invece più rappresentate nella settima e ottava decade di vita [24].

Queste neoplasie presentano un'elevata variabilità istologica ma gli istotipi predominanti si riducono essenzialmente a 4: due sono benigni, e sono l'adenoma pleomorfo, che da solo rappresenta il 60% circa dei MSGT, e il tumore di Warthin, che corrisponde al 10%. Le altre due sono neoplasie maligne e sono il carcinoma mucoepidermoide (circa il 30%

degli istotipi maligni) e il carcinoma adenoidocistico (10% delle primitività maligne). Considerando globalmente tutte le primitività salivari, esiste un'incidenza maggiore nella donna rispetto all'uomo, nello specifico tra i tumori maligni la predilezione per il sesso femminile si presenta con rapporto di 3:2 per il carcinoma mucoepidermoide, il carcinoma adenoidocistico ed il carcinoma a cellule aciniche, e di 2:1 per l'adenocarcinoma polimorfo a basso grado e il carcinoma epimioepiteliale [24]. Come risulta dalla letteratura internazionale, a tutt'oggi le radiazioni ionizzanti costituiscono l'unico fattore di rischio ufficialmente riconosciuto, in grado di interagire soprattutto attraverso trattamenti radioterapici, ma anche indagini radiologiche, radiazioni di origine occupazionale, radiazioni ultraviolette, incidenti nucleari ed esplosioni atomiche [29], [4]. L'esposizione a dosi anche ridotte di radioterapia a livello del capo, del collo o del mediastino superiore, soprattutto in età giovanile, determina un aumento del rischio di sviluppare importanti alterazioni a carico delle ghiandole salivari, ma solo se queste sono effettivamente incluse nei campi d'irradiazione [4]. Tra le neoplasie radioindotte, gli istotipi maggiormente rappresentati risultano essere il tumore di Warthin tra i tumori benigni ed il carcinoma mucoepidermoide tra i maligni [4].

Le neoplasie salivari benigne possono a loro volta rappresentare un fattore di rischio intermedio dato dalla potenziale capacità di trasformazione maligna [30].

Nella patogenesi di tali neoplasie, è stato chiamato in causa un certo numero di virus, in particolare è nota l'associazione esistente tra il virus di Epstein Barr e il carcinoma linfoepiteliale [31].

Anche alcune esposizioni professionali potrebbero essere responsabili di un incremento del rischio relativo per lo sviluppo di MSGT: maggiormente indiziate sono le polveri di metalli (leghe di nichel) o di minerali (silicio) e le sostanze radioattive [33].

Per quanto riguarda l'alimentazione, una dieta ricca di frutta e verdura, contenenti soprattutto vitamina C e A, e una ridotta assunzione di cibi ricchi di colesterolo possono svolgere una generica funzione preventiva nei confronti dei MSGT [29].

Di particolare interesse sembra invece la relazione esistente tra il fumo di sigaretta e il tumore di Warthin. Il meccanismo patogenetico che porterebbe allo sviluppo di questo istotipo non è chiaro, anche se è stato ipotizzato che agenti irritanti presenti nel tabacco, quali benzopirene, arsenico e N-nitrosoguanidina, passando attraverso l'orifizio di sbocco del dotto di Stenone, potrebbero provocare fenomeni di metaplasia e di crescita tumorale a carico del tessuto salivare contenuto in alcuni linfonodi intraparatidei [29], [31].

I possibili effetti cancerogeni indotti dai campi di radiofrequenza elettromagnetica emessi dai telefoni cellulari hanno costituito in questi ultimi anni, viste le attuali proporzioni commerciali del prodotto, notevole motivo di interesse e sono divenuti sempre più oggetti di studio. Le ricerche epidemiologiche apparse a tutt'oggi in letteratura hanno focalizzato l'attenzione sulla possibile associazione tra telefonia mobile e rischio di tumori cerebrali, tenendo conto dell'elevata esposizione ai campi elettromagnetici che comporta la stretta vicinanza esistente tra antenna del telefono mobile e lobo temporale [5], [6], [7]. Altro bersaglio è indubbiamente la ghiandola parotide, che risultano soprattutto esposta all'assorbimento delle microonde generate da cellulari e cordless. Ad oggi

le evidenze a riguardo sono deboli, soprattutto per quanto riguarda l'esposizione a breve termine [6], [7].

1.2 TUMORI MALIGNI DELLE GHIANDOLE SALIVARI

1.2.1 Classificazione istologica

I MSGT compongono un gruppo estremamente numeroso ed eterogeneo di malattie e i criteri per la loro classificazione possono essere numerosi (clinici, citologici, istogenetici) [8], [2].

L'inquadramento di tali lesioni neoplastiche si basa principalmente sull'analisi di alcuni aspetti fondamentali quali sono l'origine della lesione (neoformazione primitiva o secondaria), la natura della lesione sulla base di criteri evolutivi (benigna o maligna) e l'istotipo (con particolare attenzione rivolta alla distinzione tra neoplasie epiteliali e non epiteliali) [8].

La classificazione istologica dei MSGT di riferimento al momento è quella elaborata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2005 (Fig.2).

Per quanto riguarda l'istotipo, risulta che la più alta percentuale dei tumori delle ghiandole salivari maggiori origini dalle cellule dell'epitelio ghiandolare ed ha più frequentemente un comportamento biologico non aggressivo e una storia naturale di lesione benigna, i tumori maligni invece corrispondono circa al 15-32% delle localizzazioni [2].

Le neoplasie maligne salivari hanno uno sviluppo iniziale prevalentemente in forma nodulare a crescita espansiva asintomatica, mentre in un secondo tempo manifestano la loro malignità assumendo aspetti

Malignant epithelial tumours			
Acinic cell carcinoma	8550/3	Basal cell adenoma	8147/0
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3	Warthin tumour	8561/0
Adenoid cystic carcinoma	8200/3	Oncocytoma	8290/0
Polymorphous low-grade adenocarcinoma	8525/3	Canalicular adenoma	8149/0
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3	Sebaceous adenoma	8410/0
Clear cell carcinoma, not otherwise specified	8310/3	Lymphadenoma	
Basal cell adenocarcinoma	8147/3	Sebaceous	8410/0
Sebaceous carcinoma	8410/3	Non-sebaceous	8410/0
Sebaceous lymphadenocarcinoma	8410/3	Ductal papillomas	
Cystadenocarcinoma	8440/3	Inverted ductal papilloma	8503/0
Low-grade cribriform cystadenocarcinoma		Intraductal papilloma	8503/0
Mucinous adenocarcinoma	8480/3	Sialadenoma papilliferum	8406/0
Oncocytic carcinoma	8290/3	Cystadenoma	8440/0
Salivary duct carcinoma	8500/3		
Adenocarcinoma, not otherwise specified	8140/3	Soft tissue tumours	
Myoepithelial carcinoma	8982/3	Haemangioma	9120/0
Carcinoma ex pleomorphic adenoma	8941/3		
Carcinosarcoma	8980/3	Haematolymphoid tumours	
Metastasizing pleomorphic adenoma	8940/1	Hodgkin lymphoma	
Squamous cell carcinoma	8070/3	Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3
Small cell carcinoma	8041/3	Extranodal marginal zone B-cell lymphoma	9699/3
Large cell carcinoma	8012/3		
Lymphoepithelial carcinoma	8082/3	Secondary tumours	
Sialoblastoma	8974/1		
Benign epithelial tumours			
Pleomorphic adenoma	8940/0		
Myoepithelioma	8982/0		

(fig.2. Classificazione istologica dei MSGT secondo l'OMS)

infiltrativi a carico delle strutture adiacenti con la comparsa dei relativi sintomi [9], [11]. La paralisi del nervo faciale, che è il sintomo principale di infiltrazione maligna, compare solo nel 14% dei casi di carcinoma parotideo [9], [11].

Di seguito saranno brevemente descritti i principali isotipi maligni primitivi.

Carcinoma Mucoepidermoide: è il MSGT maligno più comune sia negli adulti che nei bambini, colpisce con un rapporto femmine: maschi di 3:2 e l'età media di insorgenza risulta circa 45 anni. Tale neoplasia maligna dell'epitelio ghiandolare è caratterizzata da cellule mucipare, intermedie ed epidermoidali con caratteristiche colonnari, a cellule chiare e oncocitoidi. Le ghiandole salivari maggiori sono interessate nel 53% dei casi (45% parotide, 7% sottomandibolare e 1% sottolinguale). Questo tumore si presenta come una massa solida e fissa, non dolente. In fase

avanzata possono comparire deficit del VII nervo cranico, dolore, disfagia, trisma [10], [32].

La diffusione è primariamente locoregionale ma metastasi a distanza possono interessare soprattutto polmone, fegato, osso e cervello.

Carcinoma a cellule aciniche: neoplasia epiteliale in cui almeno alcune cellule neoplastiche dimostrano una differenziazione sierosa acinare, caratterizzata da granuli di zimogeno secretori citoplasmatici. Sono presenti anche cellule salivari duttali. Circa l'80% delle neoplasie si trova localizzata nella ghiandola parotidea, si manifesta con una tipica massa solitaria a lento accrescimento, mobile sui piani circostanti e saltuariamente risulta aderente alla cute o al tessuto muscolare [10], [32]. Circa un terzo dei pazienti sviluppa sintomatologia algica, mentre un 5-10% presenta un deficit del VII nervo cranico. Nella maggioranza dei pazienti i sintomi perdurano da meno di un anno. La maggior parte di questi tumori metastatizza in primo luogo ai linfonodi cervicali e solo successivamente a distanza; il polmone è la sede più colpita.

Il tasso di recidiva di questa malattia è di circa il 35%, mentre metastasi e morte per malattia si attestano al 16% [10], [32].

Adenocarcinoma: neoplasia maligna epiteliale caratterizzata da uniformità citologica e diversità istologica, esibisce una differenziazione duttale senza però presentare caratteristiche specifiche di altri carcinomi salivari. Questo risulta il secondo istotipo più frequente tra i MSGT maligni con un'età media di insorgenza intorno a 60 anni. Clinicamente si presenta come una massa solitaria e asintomatica, anche se nel 20% dei casi può

essere presente dolore o paresi del nervo faciale. Presenta un basso potenziale metastatico [10], [32].

Carcinoma adenoidocistico: è un tumore basaloide costituito da cellule epiteliali e mioepiteliali disposte in varie configurazioni morfologiche (pattern tubulare, solido e cribriforme).

Costituisce circa il 10% di tutte le neoplasie salivari epiteliali e coinvolge soprattutto le parotidi, le sottomandibolari e le ghiandole salivari minori. Non c'è una predilezione di sesso e insorge più frequentemente nell'età adulta. Clinicamente si manifesta come una massa a crescita lenta e spesso dolorabile per la sua propensione all'invasione perineurale. Per lo stesso motivo si può manifestare paresi del nervo faciale [10], [32].

La sopravvivenza è influenzata dal pattern istologico, dalla sede di insorgenza del tumore, dallo stadio, dall'eventuale invasione ossea e dalla riuscita dell'exeresi chirurgica. La sopravvivenza a 5 anni è del 35%, ma l'80-90% dei pazienti muoiono entro 10-15 anni per metastasi a distanza [10], [32].

1.2.2 Diagnosi

La presentazione clinica tipica di un MSGT maligno è una massa nodulare che presenta un tasso di crescita particolarmente rapido e può determinare l'insorgenza di dolore, anche se una crescita lenta e indolente non esclude comunque la possibile natura maligna del tumore [2]. Sono segni di una neoplasia maligna anche la presenza di coinvolgimento e infiltrazione della cute sovrastante la lesione, la presenza di linfadenopatie laterocervicali omolaterali oppure la presenza di deficit della motilità facciale. Nella forma più avanzata si possono manifestare

tragitti fistolosi tra la lesione e la cute oppure il trisma. Per individuare eventuali tumefazioni linfonodali è necessaria la palpazione del collo: il riscontro di linfadenopatie laterocervicali dure, omolaterali alla lesione, non dolenti, pone il sospetto per una natura maligna della lesione [2]. Per confermare la lesione sospetta è necessaria la diagnosi strumentale tramite ecografia oppure risonanza magnetica nucleare (RMN).

L'Ecografia è una procedura economica, di facile attuazione, priva di invasività e totalmente sicura per il paziente, può essere considerata la tecnica di prima scelta nella valutazione diagnostica delle masse parotidiche superficiali e sottomandibolari. Durante lo studio ecografico di un sospetto MSGT viene valutato se la lesione si trova all'interno della ghiandola, oppure se si tratta di una neoplasia extraghiandolare, determinata la presenza di aree solide, cistiche o miste nel contesto della massa, il grado di vascolarizzazione, la definizione dei contorni, la presenza o meno di linfadenopatie e l'eventuale natura multicentrica della malattia. Ecograficamente i segni principali di malignità sono l'assenza di margini ben definiti e un'alta vascolarizzazione intratumorale [27].

La RMN è un mezzo imprescindibile per attuare una corretta stadiazione in caso di sospetta o accertata natura maligna del tumore. Questa metodica di indagine è indispensabile quando è presente una lesione del lobo profondo parotideo, in caso di localizzazione retromandibolare o quando vi è una ghiandola parotidea altamente ecogena, casi per cui l'ecografia risulta poco utile. La risoluzione spaziale e di contrasto che riesce a fornire la RMN è eccellente ed è superiore alla TC nella valutazione

dell'interfaccia tra muscoli e tumore, senza dover ricorrere all'utilizzo di radiazioni ionizzanti. I segni che fanno porre il sospetto per una lesione di tipo maligno alla risonanza magnetica sono l'ipointensità in T2 (segno di elevata cellularità della lesione), la mancata definizione dei margini a seguito dell'iniezione del mezzo di contrasto e l'interessamento simultaneo del lobo superficiale e profondo della parotide. La sensibilità e la specificità della RMN nell'identificare le neoplasie maligne sono rispettivamente del 70 e 75% [27].

La sola diagnostica per immagini non è spesso sufficiente pertanto, nella maggioranza dei casi, si ricorre alla citologia agoaspirativa con ago sottile di calibro variabile di 22-27 Gauge (inferiore a 0.7 mm) e lunghi 2-4 cm (*Fine Needle Aspiration Biopsy-FNAB*), che consente di ricavare un campione citologico da cui ottenere informazioni diagnostiche [12], [17]. Il medico, localizzata la lesione attraverso la sonda ecografica, posiziona correttamente l'ago e procede all'aspirazione, una parte del materiale viene strisciata sul vetrino per eseguire l'esame estemporaneo, chiamato giudizio di idoneità, mentre la restante viene recuperata in una provetta con un fissativo [12].

1.2.3 Terapia

In seguito al riconoscimento della neoplasia maligna viene pianificato un intervento chirurgico, nello specifico viene eseguita la parotidectomia, che può essere totale, cioè consiste nella rimozione della parotide nella sua interezza, oppure superficiale, in cui si procede all'asportazione del solo lobo parotideo superficiale [13], [3]. L'approccio chirurgico naturalmente richiede una precisa conoscenza da parte dell'operatore dell'anatomia

della regione, che ospita, oltre al tessuto ghiandolare, strutture vascolari, muscolari e soprattutto nervose molto importanti. In particolare, ogni tecnica è condizionata dalla presenza del nervo faciale e non può prescindere dalla ricerca dell'emergenza del tronco comune del nervo faciale e dalla sua dissezione, parziale o totale [25]. Il sacrificio del nervo faciale si rende necessario in caso di riscontro intraoperatorio di infiltrazione del nervo, oppure in caso di paralisi facciale preoperatoria. La disfunzione del nervo faciale è pertanto la complicanza più importante della parotidectomia e in molti casi può compromettere la qualità della vita postoperatoria del paziente [13].

Oltre all'intervento chirurgico nelle neoplasie maligne può essere utilizzata la radioterapia come terapia adiuvante mentre la chemioterapia è usata raramente [14].

1.3 TESSUTI FISSATI IN FORMALINA E INCLUSI IN PARAFFINA (FFPE)

1.3.1 Scopo della fissazione ed inclusione di un campione biologico

Lo scopo della fissazione è quello di interrompere velocemente i processi autolitici delle cellule poiché la rimozione del tessuto dal suo ambiente vitale determina la mancanza di nutrienti ed ossigeno oltre ad una variazione di temperatura e pH. La fissazione inoltre consente di preservare i campioni dall'attacco di muffe e batteri che potrebbero proliferare nutrendosi delle strutture non più in grado di proteggersi e permette di conservare al meglio la morfologia strutturale ed ultrastrutturale del tessuto e della cellula. Dalla fissazione dipende la buona riuscita di un preparato istologico poiché permette di mantenere il

più possibile inalterato il quadro strutturale dei tessuti, dunque la fissazione è l'operazione più importante della tecnica istologica. Tale processo consente inoltre al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle successive fasi di disidratazione, inclusione e sezionamento.

1.3.2 Prelievo dei campioni

Per ottenere buoni preparati, è necessario che il materiale prelevato sia molto fresco. Infatti, dopo il prelievo, la fase successiva di fissazione deve avvenire nel più breve tempo possibile, per evitare le alterazioni autolitiche. Se non possibile, i preparati devono almeno essere refrigerati in attesa del trattamento con i fissativi. In secondo luogo, è conveniente che i pezzi da fissare non superino 1 cm di diametro. Pertanto, dopo l'espianto, è necessario operare un sezionamento del tessuto o organo, utilizzando pinzette e forbici (o lame) molto affilate, cercando di evitare al massimo deformazioni o compressioni improprie [36]. La fase di sezionamento preliminare deve avvenire sempre in ambiente umido, per evitare l'essiccamento del campione che potrebbe produrre alterazioni nel tessuto. Quindi, il sezionamento deve avvenire a campione immerso in soluzione fisiologica, o anche al di sopra di garze preventivamente imbevute di soluzione. Una volta sezionati, i campioni dovranno essere lavati con soluzione fisiologica per eliminare tracce di sangue o altri liquidi organici [36].

1.3.3 Fissazione in formalina

La formaldeide o aldeide formica è un gas di odore pungente e irritante che viene prodotta e commercializzata normalmente sotto forma di soluzione acquosa, con il nome di formalina. La formalina è il fissativo per eccellenza dei tessuti prelevati per diagnosi anatomopatologica, poiché mantiene inalterata la morfologia cellulare e l'architettura del tessuto, inoltre la maggior parte degli anticorpi in commercio per indagini immunocitochimiche su tessuto sono prodotti per riconoscere siti antigenici la cui conformazione è modificata dalla fissazione in formalina [36]. Nelle strutture sanitarie la formalina può essere utilizzata per la conservazione e come mezzo di trasporto di tessuti derivati da interventi chirurgici e biopsie nelle sale operatorie e negli ambulatori di prelievo biptico.

Ad oggi non è ancora disponibile una valida alternativa alla formaldeide come fissativo dei tessuti nei servizi di anatomia patologica, risultandone indispensabile l'utilizzo ferma restando l'applicabilità obbligatoria delle procedure preventive a tutela della salute dei soggetti esposti.

La Formaldeide nei laboratori di Anatomia Patologica è usata come Formalina Neutra Tamponata per prevenirne l'acidificazione dovuta alla tendenza ad essere ossidata ad acido formico. La soluzione tamponata aumenta la formazione di formalina monomerica (glicole di metilene) come reagente di fissazione. La formaldeide, essendo una molecola piccola e leggera, può evaporare facilmente. La cinetica di evaporazione dipende dalla temperatura, umidità e ricambio di aria. L'emivita nell'ambiente della formaldeide è molto breve, poiché in aria è

rapidamente rimossa da processi fotochimici, precipitazione ed è velocemente biodegradabile. La formaldeide ha una penetrazione nei tessuti di circa 1 mm/ora (dovuta al glicole metilenico) e produce una lenta fissazione (dovuta a un legame covalente dei gruppi carbossilici della formalina con proteine, glicoproteine, acidi nucleici e altre molecole). Questa proprietà chimica, che risulta essere un limite per l'attività di fissazione dei campioni tissutali chirurgici di grosse dimensioni, ne circonda i danni in vivo, perché facilita l'eliminazione per via respiratoria prima che vi sia il danno delle vie aeree [36]. Tuttavia, l'alta solubilità in acqua determina un elevato assorbimento da parte del muco del tratto respiratorio e delle prime vie aeree, particolarmente il naso e i seni nasali. Evidenze scientifiche sufficienti hanno definito una presunta azione come cancerogeno naso-faringeo, dei seni paranasali e in modo controverso con leucemie mieloidi [37], [38]. Dopo che la I.A.R.C. ha sancito le proprietà carcinogene della formaldeide nel 2006, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha fissato un limite di qualità dell'aria per la formaldeide di 0,1 mg/m³ su 30 minuti di prelievo [37], [38].

La formalina non è coagulante, infatti, rispetto alle proteine agisce come un additivo perché si unisce ai gruppi NH₂ in modo tale che i gruppi idrofili delle proteine conservino il loro rapporto con le molecole d'acqua; inoltre aumentano l'acidità delle proteine e questa spiega il motivo per cui i tessuti fissati in formalina hanno maggiore affinità per i coloranti basici piuttosto che per quelli acidi [39]. Si raccomanda l'uso di formalina tamponata al 10% realizzata diluendo l'aldeide formica al 40%, commercialmente disponibile, in acqua distillata, in un rapporto di 1/10; alla soluzione così prodotta viene aggiunto il tampone, seguendo possibilmente la metodica di Lillie. Ha una capacità di penetrazione di 4

mm in 16 ore per cui il tempo di fissazione ottimale è di 24 ore per evitare che le aree più profonde non vengano raggiunte dalla formalina e vadano così incontro a fenomeni autolitici. E' vivamente consigliata la fissazione a temperatura ambiente (non in inclusore) [39]. Il rapporto volumetrico tra il campione bioptico ed il fissativo deve essere di circa 1/20.

Dopo la fissazione, i preparati devono essere lavati accuratamente in acqua corrente. L'operazione viene eseguita per eliminare l'eccesso di fissativo che, non avendo interagito con i componenti tissutali, è rimasto all'interno dei campioni e potrebbe interagire con i reattivi impiegati nelle fasi successive, in particolare con le sostanze usate per la colorazione dei campioni. Il lavaggio dei campioni di grandi dimensioni può essere effettuato mantenendo i pezzi all'interno del contenitore ove si è effettuata la fissazione ed esponendoli direttamente al flusso di acqua corrente [39].

In seguito al lavaggio viene eseguita la disidratazione cioè si sottopone il tessuto ad un passaggio graduale in etanolo a concentrazione progressivamente crescente, per tempi di permanenza in ciascuna concentrazione variabili a seconda delle dimensioni del pezzo. Questo processo viene eseguito perché le sostanze includenti hanno lo svantaggio d'essere apolari, idrofobiche, insolubili nell'acqua di cui sono costituite le cellule dei tessuti. Affinché il mezzo d'inclusione possa penetrare nel tessuto, è necessario eliminare da esso l'acqua.

1.3.4 Inclusione in paraffina

La paraffina è una miscela di cere a vari punti di fusione, usata nell'allestimento di preparati istologici per la microscopia ottica.

L'inclusione in paraffina permette generalmente di ricavare sezioni aventi spessore minimo pari a 1-2 μm [40]. Inoltre è insolubile sia in acqua che in etanolo per questo occorre inserire, dopo la disidratazione, la fase di chiarificazione con xilolo, un solvente intermedio miscibile sia con l'etanolo che con la paraffina, che sostituisce rapidamente l'etanolo ed indurisce fortemente il tessuto. La paraffina, prima dell'uso, deve essere sciolta alla temperatura di circa 57-59 °C, e poi filtrata per eliminare eventuali impurità [40]. Dopo la fase di infiltrazione, i campioni vengono alloggiati in contenitori sagomati in cui è fatta colare paraffina liquida ed il tutto è lasciato solidificare a temperatura ambiente. A completa solidificazione avvenuta, il blocchetto solido viene estratto dal contenitore processato per la successiva fase di sezionamento.

I tempi minimi d'infiltrazione sono di tre ore mentre non esistono tempi massimi perché il campione, una volta infiltrato dalla paraffina, non si deteriora.

1.4 PROTEOMICA

Il termine proteoma è stato coniato nel 1994 da Mark e consiste nella fusione delle parole "proteine" e "genoma", quindi la proteomica può essere definita come lo studio di tutte le proteine espresse in un dato organismo, tessuto o cellula. Poiché la sintesi delle proteine può derivare anche dall'unione di più geni espressi o dalla loro modifica post-trascrizionale, le dimensioni del proteoma risultano di gran lunga maggiori rispetto al genoma stesso [15]. Sarebbe un errore definire il proteoma come un'entità statica considerando che, talvolta, le cellule di un medesimo organo esprimono proteine differenti e che lo stesso tipo di

cellule anche al variare delle condizioni fisiologiche (età, malattia, ambiente) potrebbe esprimere diversi tipi di proteine. Il proteoma è quindi un'entità dinamica, poiché l'espressione proteica varia non solo tra organi e tessuti di uno stesso organismo, ma anche all'interno delle stesse popolazioni cellulari a seguito di eventi stressogeni o cambiamenti fisiologici cui le cellule vanno incontro [15].

In definitiva, la proteomica svolge il complesso compito di identificare tutte le proteine di un dato sistema biologico, definirne la struttura, stabilire in quali quantità sono espresse, caratterizzare la loro funzione, le loro attività e le interazioni che instaurano tra esse. La tecnologia attualmente più utilizzata nell'ambito della proteomica è la "spettrometria di massa" (MS), questa rappresenta la tecnica più sensibile e versatile per lo studio delle proteine e viene utilizzata per quantificare le proteine e per determinare sequenza, massa e informazioni strutturali [16]. La combinazione della MS, per l'identificazione proteica, con l'elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è la procedura ottimale per l'analisi globale di proteine in quanto si è dimostrata in grado di separare, quantificare ed identificare migliaia di proteine presenti in un singolo gel [16]. Attraverso la metodica dell'elettroforesi bidimensionale si possono valutare eventuali alterazioni nei livelli di espressione, nella fosforilazione e nelle modificazioni post-traduzionali; per ottenere infine tutte le ulteriori informazioni sulle proteine di interesse vengono identificati gli spots con le metodiche di spettrometria di massa.

Gli studi di proteomica di espressione sono indirizzati all'analisi delle differenze del pattern di espressione tra cellule anormali e sane, attraverso l'identificazione di bande proteiche che compaiono (o

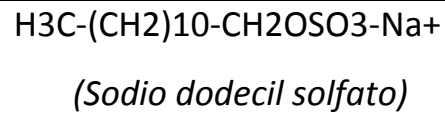
scompaiono) o che sono presenti in livelli quantitativi diversi. Nelle applicazioni biomediche, quest'approccio comparativo viene di solito utilizzato per identificare proteine il cui livello di espressione aumenta o diminuisce in seguito all'insorgere di una patologia e che possono quindi essere utilizzate come marker specifici per la diagnosi o a scopo terapeutico [28].

1.4.1 SDS-PAGE

L'elettroforesi è una tecnica che consiste nella migrazione differenziata in un campo elettrico di molecole elettricamente cariche. A qualunque pH diverso dal pI le proteine hanno una carica netta quindi, se poste in un campo elettrico, migrano verso l'elettrodo di carica opposta. L'elettroforesi SDS-PAGE prevede l'utilizzo del gel di poliacrilamide come supporto poiché è chimicamente inerte, privo di carica e stabile in un ampio ambito di temperatura, pH e osmolarità. I gel di poliacrilammide vengono preparati al momento dell'uso facendo copolimerizzare acrilamide con metilen-bisacrilammide, un agente cross-linkante, in presenza di un catalizzatore come il persolfato di ammonio (APS) e un iniziatore come il TEMED. Questa polimerizzazione radicalica viene fatta avvenire all'interno dello spazio compreso tra due vetri, in modo da ottenere una matrice piatta. La dimensione dei pori del gel è funzione della quantità totale di monomeri (% T) presenti nella soluzione, generalmente al crescere di % T la dimensione dei pori decresce perché l'acrilammide è più concentrata, per cui aumenta l'effetto di setacciamento.

La miscela proteica, prima di essere sottoposta alla corsa elettroforetica, viene trattata con il sodio dodecil solfato (SDS), detergente anionico che

spezza tutte le interazioni non covalenti delle proteine native, e β -Mercaptoetanolo per ridurre i legami disolfuri.

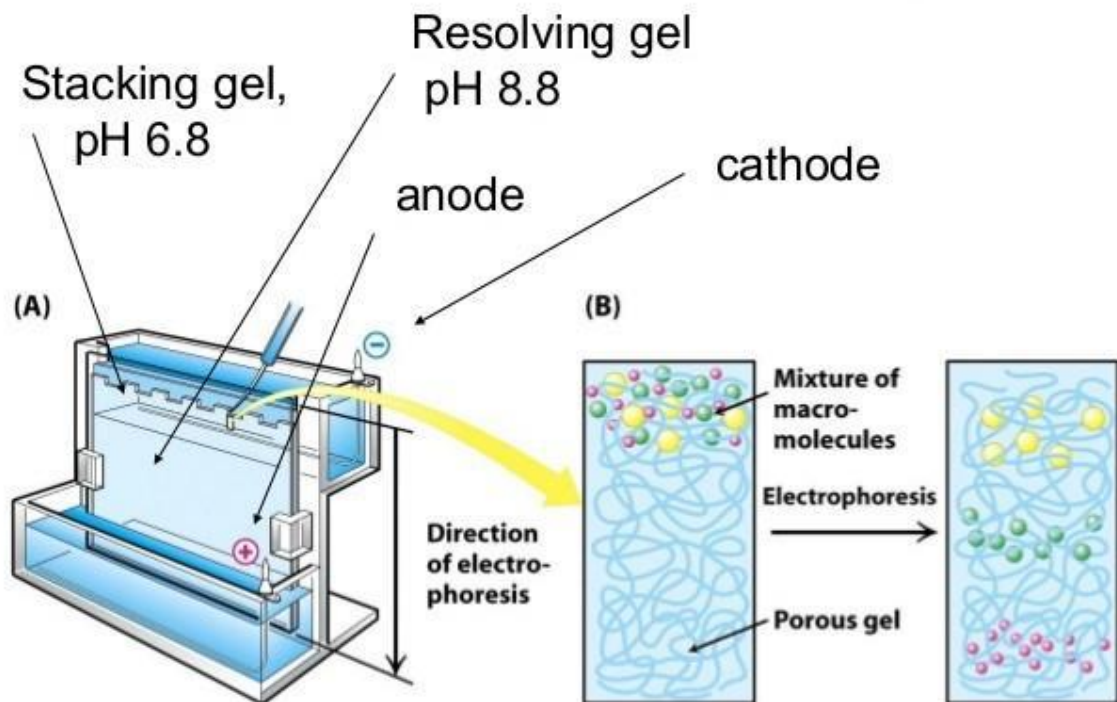


Gli anioni dell'SDS si legano alle proteine con un rapporto preciso, una molecola di SDS ogni due residui amminoacidici, e questo comporta la denaturazione della proteina (fig.3). I complessi SDS-proteina denaturata hanno una carica negativa per cui, se sottoposte ad un campo elettrico, le proteine migrano dal catodo (carico negativamente) all'anodo (carico positivamente) unicamente in funzione della loro massa molecolare.



(fig.3. Azione denaturante dell'SDS)

La velocità con cui avviene la migrazione elettroforetica (V_e) è direttamente proporzionale alla carica della particella (q) e al campo elettrico applicato ($E=V/d$) e inversamente proporzionale alla viscosità (η) e alle dimensioni della particella (r), quindi nel caso di particelle aventi la stessa carica, migrerà più velocemente la particella di raggio minore (fig.4).



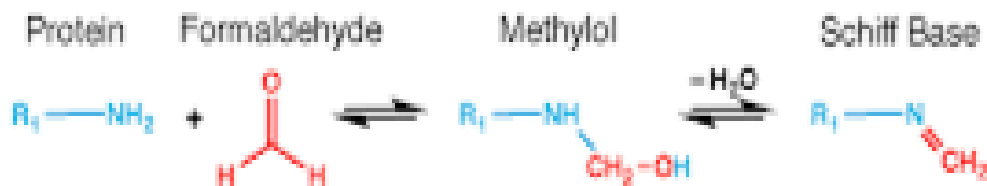
(fig.4. SDS-PAGE)

1.5 STUDI PROTEOMICI SU TESSUTI FFPE

L'elevata presenza di tessuti FFPE negli archivi ospedalieri di tutto il mondo ha indotto i ricercatori ad approfondire gli studi sull'analisi proteomica di tali tessuti. I due principali problemi cui i ricercatori devono fare fronte sono l'insolubilità della paraffina in acqua e le modificazioni chimiche che questa pratica comporta sulle proteine, in particolare la degradazione proteica e la formazione di proteine crosslinked [41], [49]. La formaldeide, infatti, reagisce con le proteine o i peptidi formando un metilolo instabile che per disidratazione forma una base di Schiff. In un secondo step, tale base interagisce con alcuni amminoacidi formando dei ponti metilenici intra-catena ed inter-catena molto stabili (fig.5). Queste

modificazioni hanno fatto sì che tali tessuti siano stati considerati per lungo tempo inadatti per un'analisi proteomica basata sulla spettrometria di massa [41], [49].

Step 1



Step 2



(Fig.5. meccanismo della formazione di proteine crosslinked)

1.5.1 Deparaffinizzazione ed estrazione proteica

I campioni di tessuto FFPE vengono, in primo luogo, trattati con solventi apolari per rimuovere la paraffina (tab.1). Il solvente utilizzato a tale scopo nella quasi totalità dei casi è lo Xilene, un idrocarburo aromatico derivato del benzene, che solubilizza la paraffina e ne permette l'eliminazione. Lo xilene presenta attività neurotossica per cui in letteratura sono sempre più frequenti studi su procedure alternative non tossiche come quella che prevede l'utilizzo di olio minerale [48] oppure l'acqua distillata a 95°C [50].

La procedura di deparaffinizzazione prevede che il tessuto venga sottoposto alla reidratazione in seguito all'utilizzo del solvente apolare.

Nel caso dello xilene, la reidratazione viene eseguita sottoponendo il campione ad un trattamento con etanolo in concentrazione decrescente (dal 100% al 70%).

<u>SOLVENT</u>	<u>REHYDRATION</u>
Heptane	Methanol
Octane	Not available
Toluene	Ethanol 100%
Xylene	Ethanol 100%-85%-70%
Mineral oil	Not available
Sub-X xylene substitute	Ethanol 100%-85%-70%

(Tab.1. Procedure di deparaffinizzazione)

Il passaggio più importante nell'analisi proteomica dei tessuti FFPE è il recupero delle proteine in seguito alla deparaffinizzazione rompendo i ponti metilenici intra ed inter-catena. Le numerose pubblicazioni presenti in Letteratura a riguardo indicano l'utilizzo del calore come mezzo per migliorare la resa delle proteine estratte in quanto favorisce l'idrolisi dei ponti metilenici [44], [47]. Come tampone di estrazione il più utilizzato per questi tessuti è il Tris a differenti pH (da 4 a 9) con l'aggiunta di glicerolo al 20% e urea 8M. Il risultato migliore con il tampone Tris è stato ottenuto in presenza del detergente SDS alla concentrazione tra 2 e 4% che si è dimostrata più efficace ai fini della resa proteica rispetto alla glicina 200mM o al 2,2,2, trifluoroetanololo. In realtà la presenza della glicina o del glicerolo non influenza l'estrazione stessa ma sembra che abbia un effetto

stabilizzante sul campione nell'elettroforesi bidimensionale mentre l'utilizzo di agenti riducenti come β -mercaptoetanolo al 4-10% o DTT 200mM sembra che influenzi in piccola parte la resa proteica [49].

Uno studio precedente, condotto dal gruppo di ricerca con cui ho svolto questo lavoro di tesi [47], ha comparato gli estratti proteici di tessuti FFPE di adenoma della paratiroide, ottenuti utilizzando tampone Tris a diversi valori di pH. L'estrazione è stata effettuata sospendendo i campioni in Tris 20mM con SDS al 2% e glicina 0,2M portato con HCl a pH 4,6 oppure 9. L'esaminazione degli spot ottenuti tramite elettroforesi 2-DE ha dimostrato che i risultati migliori in termini di estrazione proteica sono stati ottenuti utilizzando un tampone a pH 6.

1.5.2 Caratterizzazione proteomica degli estratti da tessuto FFPE

Un approccio classico nell'analisi proteomica è quello "gel-based" [45], [43], [42]; tale tecnica permette la separazione e la quantificazione proteica tramite l'elettroforesi 1D oppure quella 2D, che combina l'isoelettrofocalizzazione all'SDS-PAGE. Per la caratterizzazione degli estratti proteici da tessuti paraffinati questo approccio non si è dimostrato ottimale, in particolare sono state riscontrate difficoltà nell'ottenere immagini affidabili, riproducibili e di alta qualità. Il confronto tra le mappe proteiche 2D dei tessuti FFPE e di quelli congelati freschi è reso difficile dalla bassa qualità delle prime oltre che dal numero limitato di spot visibili. L'analisi proteomica dei tessuti paraffinati basata sui gel risulta tuttavia un campo da esplorare ulteriormente e il potenziale della vasta

gamma di metodi, che vanno da GeLC-MS/MS al 2D-DIGE, devono essere completamente ed efficacemente sfruttati [49].

Per la caratterizzazione proteomica di questi tessuti può essere impiegata la spettrometria di massa e nello specifico la tecnica MALDI-IMS (imaging mass spectrometry), un potente e diffuso strumento analitico utilizzato in molti campi scientifici [46]. In seguito alla deparaffinizzazione viene eseguita una digestione enzimatica *in situ* di una piccola porzione del tessuto seguita dalla ionizzazione del campione. Per la rilevazione è preferibile l'analisi TOF (time of flight) in cui i peptidi ionizzati vengono sottoposti tutti allo stesso impulso e percorrono uno stesso tratto con un tempo proporzionale alla loro massa.

Un ulteriore approccio è quello LC-MS/MS shotgun che assicura una migliore identificazione proteica con la copertura di un largo range di pesi molecolari.

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di uno studio proteomico che ha lo scopo di riconoscere potenziali biomarcatori tumorali delle neoplasie parotidiche. Uno studio precedentemente condotto presso l'Università di Pisa, dal gruppo di ricerca con cui ho svolto la tesi, ha indagato l'espressione proteica dei tumori salivari benigni [18]. Più recenti sono invece gli studi riguardo al profilo proteomico dei MSGT maligni; in particolare è stata eseguita un'analisi proteomica comparativa tra campioni di citologia agoaspirativa di tumori maligni della ghiandola parotidea e campioni agoaspirati di adenoma pleomorfo. Confrontando le immagini ricavate dai gel 2D, è stata osservata un'espressione differenziale di alcune proteine e gli spots corrispondenti sono stati sottoposti ad analisi nanoLC-ESI-MS/MS per procedere alla loro identificazione. Per validare la variazione di espressione delle proteine identificate con la spettrometria di massa, è stata utilizzata la tecnica Western Blot, che ha evidenziato in particolare un'espressione differenziale significativa tra i campioni di tumori maligni, adenoma pleomorfo e sano di alcune proteine quali CFL1, ANXA1 ed alcune subunità delle proteine CAPZ. La relativa rarità e l'estrema eterogeneità delle neoplasie parotidiche maligne rendono difficile riuscire ad allestire in tempi ragionevoli dei pool di campioni omogenei congelati di una grandezza tale da poter effettuare analisi statistiche attendibili. Una fonte preziosa per lo studio di questa rara forma neoplastica sono gli archivi dei tessuti biotipici paraffinati, una risorsa alternativa in particolare nella fase di validazione

dei marcatori proteici, quando è richiesta una grande coorte di campioni e la scarsa disponibilità di tessuto congelato risulta vincolante.

L'obiettivo di questa tesi è quello di verificare, inizialmente in un numero ristretto di campioni, l'adeguatezza dell'estrazione proteica dai tessuti paraffinati e la sua validità in termini di resa qualitativa e quantitativa delle proteine, al fine di ritrovare in tale campione biologico la situazione osservata nei campioni di agoaspirato. Risultati promettenti possono aprire la strada alla messa a punto di metodologie proteomiche di estrazione che siano riproducibili e quantitative. Questo permetterebbe di poter utilizzare gli archivi di tessuti biotici paraffinati, che dispongono di un grande numero di campioni e che divengono ancora più importanti nel caso di neoplasie rare quali sono quelle parotidiche maligne.

Sulla base di queste premesse, in questo lavoro di tesi, sono stati ricercati i biomarcatori CFL1, CAPZA1 e ANXA1 sugli estratti proteici da tessuti FFPE.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONE

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

La determinazione della concentrazione proteica dei campioni è stata valutata utilizzando uno spettrofotometro LAMBDA 25 UV/Vis Systems (PerkinElmer, USA) controllato dal software LAMBDA 25 (PerkinElmer, USA).

L'apparecchio impiegato per l'elettroforesi delle proteine è il Mini Protean® Tetra System (Biorad) con alimentatore Power Pac Universal (Biorad).

I vetri utilizzati per colare i gel sono Mini-PROTEAN® Spacer Plates With 0.75 mm Integrated Spacers e Mini-PROTEAN® Spacer Plates With 1.5 mm Integrated Spacers, entrambi forniti dalla Bio-Rad.

Per il Western Blot sono state utilizzate membrane di nitrocellulosa Midi format 0.2µm specifiche per l'apparecchio Trans-Blot® Turbo™, Transfer System (Biorad).

Le immagini in chemiluminescenza e fluorescenza sono state acquisite tramite lo strumento ImageQuant LAS 4010 dell'azienda GE Healthcare Bio- Sciences AB (Uppsala, Svezia).

Per asciugare i campioni deparaffinati è stato utilizzato lo SpeedVac Concentrator modello RT4104 220.

3.2 RECLUTAMENTO DEI CAMPIONI

Questo studio è stato condotto su 11 pazienti affetti da neoplasia maligna delle ghiandole parotidiche e indirizzati a trattamento chirurgico presso l'UO Otorinolaringoiatria 1 Univ. dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana (AOUP), diretta dal Prof. Stefano Sellari Franceschini, nel periodo compreso tra il gennaio 2010 ed il giugno 2015. Lo studio proteomico comparativo è stato effettuato confrontando questo gruppo di pazienti con 5 pazienti affetti da neoplasia benigna e 3 pazienti sani. Il progetto di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico dell'AOUP e per tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato.

3.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Le modalità di raccolta e il trasporto di campioni al servizio di Anatomia Patologica sono fondamentali per garantire la stabilità delle componenti strutturali e biologiche del tessuto asportato. I tessuti sono stati sottoposti alla fissazione in formalina e inclusione in paraffina nei laboratori di anatomia patologica e sono giunti presso il laboratorio di proteomica diretto dai Prof. Gino Giannaccini e Prof. Antonio Lucacchini del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa inserite in microprovette con apposta l'etichetta che permette la corretta identificazione del campione.

3.4 PROTOCOLLO DI DEPARAFFINIZZAZIONE

I campioni sono stati inseriti in una eppendorf safe-lock tubes da 2,0 mL, sottoposti ad incubazione con 1.5 mL di xilene, mantenuti in agitazione per 10 minuti e successivamente centrifugati a 12000 rpm, 20 °C per 10 minuti. Terminata la centrifugazione viene aspirato e scartato il sovranatante mentre il pellet viene nuovamente sottoposto ad incubazione con lo xilene, quindi viene ripetuto l'intero processo. Tale step è stato ripetuto in totale quattro volte per avere la massima solubilizzazione e rimozione della paraffina dal tessuto.

Il pellet è stato successivamente reidratato tramite l'aggiunta di etanolo a concentrazione progressivamente decrescente. Viene aggiunto 1 mL di etanolo assoluto al tessuto, incubato per 10 minuti agitando sul vortex ripetute volte e centrifugato a 12000 rpm, 20 °C per 10 minuti. Il sovranatante viene aspirato ed eliminato, mentre sul pellet viene ripetuto nuovamente il processo utilizzando ancora etanolo assoluto, poi etanolo al 85% ed infine etanolo al 70%. Il tessuto reidratato è stato asciugato utilizzando lo SpeedVac Concentrator e conservato a -80°C.

3.5 ESTRAZIONE PROTEICA

Il tessuto è stato sospeso nel tampone di estrazione (extraction buffer) costituito da una soluzione 20mM di Tris-HCl a pH 6 contenente il 2% di SDS e glicina 0.2M. La sospensione è stata sottoposta a lisi cellulare tramite sonicazione in un bagno ad ultrasuoni per quattro cicli da 10 secondi ciascuno e lasciata in incubazione per 1 ora a 4°C sotto agitazione.

L'omogenato ottenuto è stato sottoposto ad ebollizione a 100°C per 20 minuti e successivamente lasciato in bagno termostatico per 2 ore a 60°C. L'estratto è stato centrifugato a 13000 g per 20 minuti a 4°C e il sovranatante contenente le proteine estratte viene recuperato tramite una gilson e conservato a -80°C

3.6 DOSAGGIO PROTEICO RC/DC/BIORAD

Il dosaggio proteico RC/DC è un saggio colorimetrico per la quantificazione delle proteine basato come principio sul saggio del Lowry, ma modificato a diventare compatibile ad alte concentrazioni di agenti riducenti (RC) e detergenti (DC). La presenza di una o più di queste sostanze può cambiare la risposta della proteina ai reagenti del saggio. La proteina standard con la quale costruiamo la nostra curva di riferimento dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di interesse, nel nostro caso la proteina standard albumina bovina (BSA) è risospesa nel tampone Tris-HCl con pH 6.

Vengono preparate quattro concentrazioni di proteina standard (0,2-0,4-0,8-1,5 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo con un volume totale di 25 µl.

Per il dosaggio proteico del campione incognito si procede con una diluizione 1:2 con la soluzione Tris-HCl a pH 6 in modo da avere 25 µl di volume finale. Il dosaggio viene effettuato in doppio, a temperatura ambiente.

Agli standards e al campione sono aggiunti 125 µl di Reagente I, quindi si vortexano e si mettono in incubazione per 1 minuto. Vengono aggiunti 125 µl del Reagente II, si vortexa, si lascia in incubazione per 1 minuto e si

centrifuga per 5 minuti a 12000 g, a 20°C. Il sovrnatante viene aspirato e scartato.

	Tris-HCl	BSA	[BSA] µg/µl	µg BSA
Bianco	25 µl	-	0 µg/µl	0 µg
1	21,7 µl	3,3 µl	0,2 µg/µl	4 µg
2	18,3 µl	6,7 µl	0,4 µg/µl	8 µg
3	11,7µl	13,3 µl	0,8 µg/µl	16 µg
4	-	25 µl	1,5 µg/µl	30 µg

(Tab.2. Diluizione della BSA per la retta di taratura)

Vengono aggiunti 125 µl di Reagente I, la soluzione viene vortexata e incubata per 1 minuto, quindi vengono addizionati 40 µl di Reagente II, agitati con il vortex e centrifugati a 12000 g per 5 minuti a 20°C. Il sovrnatante viene nuovamente aspirato e scartato.

Vengono addizionati 127 µl di soluzione A* (20 µl S + 1000 µl A), agitato ed incubato 5 minuti per permettere al precipitato che si scioglia dopodiché si aggiunge 1 ml di Soluzione B. Trascorsi 15 minuti viene effettuata la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 750 nm.

Dalle letture di assorbanza ottenute con concentrazioni note di proteina standard si costruisce una retta di taratura nell'intervallo di sensibilità da 5µg a 37,5µg ($y=mx$) e dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito.

3.7 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN PRESENZA DI SDS

3.7.1 Preparazione dei gel

-Preparazione del running gel o gel di separazione: la scelta della % di acrilamide viene fatta in base alle dimensioni della proteina in esame, in questo caso viene preparato al 12% perché le proteine hanno questi pesi molecolari: ANXA1 37KDa, CFL1 18KDa, CAPZA1 33KDa.

I gel di poliacrilammide vengono preparati al momento dell'uso facendo copolimerizzare acrilamide con metilen-bisacrilammide, un agente cross-linkante, in presenza di un catalizzatore come il persolfato di ammonio (APS) allo 0,1-0,3% e un iniziatore come il TEMED.

Questa polimerizzazione radicalica viene fatta avvenire all'interno dello spazio compreso tra due vetri, in modo da ottenere una matrice piatta con spessore che varia, nel nostro caso utilizziamo vetri con lo spaziatore di 0,75 mm e 1,5 mm.

Sostanza	Volume (mL)
H ₂ O mQ	4,9
30% acrylamide mix	3,8
1,5 M Tris (pH 8.8)	6
10% SDS	0,15
10% APS	0,15
TEMED	0,006

(Tab.3. Preparazione del running gel al 12% per SDS-PAGE, 15mL)

Il resolving gel viene colato tra i due vetri e viene successivamente ricoperto con uno strato di butanolo (150µl) per evitare il contatto con l'aria durante la polimerizzazione.

- Stacking gel o gel di impaccamento: ha un pH di 6,8 e un rapporto di acrilam/bis-acrilam pari al 4-5%. Appena colato il gel si dispone il pettine per la formazione dei pozzetti e si attende che avvenga la polimerizzazione, quando questo processo risulta completo viene rimosso il pettine lasciando nello stacking la serie di pozzetti pronti per il caricamento dei campioni. Lo scopo del gel di impaccamento è di concentrare le proteine in un banda sottile sotto l'effetto del campo elettrico prima che il campione entri nel gel separatore.

Sostanza	Volume mL
H ₂ O	3,4
30%Acrylamide mix	0,83
0.5 M Tris (pH 6.8)	0,63
10% SDS	0,05
10% APS	0,05
TEMED	0,005

(Tab.4. preparazione dello stacking gel 5% per SDS-PAGE, 5mL)

3.7.2 Preparazione e caricamento dei campioni

Stabilita la concentrazione proteica dei nostri campioni ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), utilizziamo un volume equivalente a 10 μg di proteine per il riconoscimento dell'ANXA1 ed un volume equivalente a 20 μg per riconoscere la CAPZA1 e la CFL1.

Vengono preparate le soluzioni da caricare nei pozzetti aggiungendo al volume calcolato di campione una soluzione di Laemmli Buffer costituita da:

- Upper buffer: soluzione Tris/HCl 0.3 M pH 6.8
- H₂O milliQ
- SDS: denatura le proteine e conferisce la stessa densità di carica negativa
- β -mercaptoetanololo: rompe eventuali ponti disolfuro
- Glicerolo: aumenta la densità dei campioni depositandoli nel pozzetto
- Blu di bromofenolo: visualizza i campioni e va a costituire il fronte di migrazione.

La soluzione contenente i campioni e la Laemmli vengono sottoposti a bollitura a 100°C per 5 minuti per accelerare la completa denaturazione delle proteine.

Viene preparata anche una soluzione contenente Biotinilated Protein Ladder (standard), per 2 μL di standard vengono aggiunti 4 μL di Laemmli. Il caricamento viene eseguito inserendo i campioni tra le due lastre di vetro mediante puntali monouso.

3.7.3 Corsa elettroforetica

La corsa elettroforetica è stata eseguita utilizzando come tampone di corsa il running buffer 1X, ottenuto dalla diluizione del running buffer 10X (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, H₂O a volume).

L'elettroforesi è stata effettuata mantenendo costante il voltaggio per tutta la durata della corsa e variando l'ampereaggio:

-per i gel da 0,75 mm è stato impostato un amperaggio di 8 mA per ciascun gel nei primi quindici minuti di corsa aumentando l'amperaggio a 20 mA per gel fino al termine della corsa (circa 1 ora);

-per i gel da 1,5 mm è stato mantenuto un amperaggio di 10 mA per gel nei primi quindici minuti e aumentato a 25 mA per gel per il tempo necessario al termine dell'elettroforesi (circa 1:30 ore).

La corsa può considerarsi terminata quando il fronte dei campioni, visualizzato tramite il Blu di bromofenolo, giunge alla fine dei gel.

3.8 WESTERN BLOT

3.8.1 Trasferimento dal gel alla nitrocellulosa

In questa tecnica le proteine, dopo esser state frazionate in SDS-PAGE, vengono trasferite su membrana di nitrocellulosa (0.2 µm) mediante Trans-Blot Turbo (fig.6), transfer system (BIO-RAD).

Tale tecnica di trasferimento è definita "semi-dry" in quanto non viene immerso in un tampone ma avviene quasi a secco, essendo solo la carta filtro all'interno del sandwich imbevuta di buffer da blotting. Le cassette

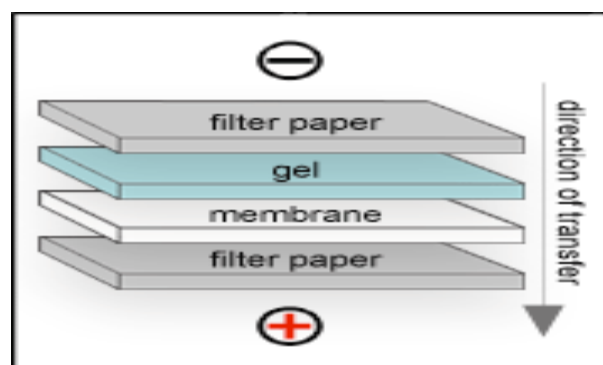
rimovibili sono costituite da due lastre di elettrodi che fungono da anodo (in platino) e da catodo (in acciaio inox).



(fig.6. Trans-blot turbo)

Il sandwich di trasferimento viene realizzato ponendo il gel verso il catodo e la nitrocellulosa verso l'anodo, applicando un campo elettrico le proteine (caricate negativamente per la presenza di SDS) dal gel si trasferiscono al foglietto di nitrocellulosa (Fig. 7).

Il tempo di trasferimento è di 7 minuti per i gel aventi uno spessore di 0.75 mm mentre per quelli con spessore di 1.5 mm sono necessari 10 minuti.



(fig.7. Schema di realizzazione del sandwich per il western blot)

3.8.2 Colorazione con rutenio

Prima di procedere con il riconoscimento di una specifica proteina utilizzando l'anticorpo specifico, viene eseguita la colorazione della nitrocellulosa con il complesso RuBP formato da ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) tetrasodium. Il RuBP è un colorante sensibile, lineare, stabile nel tempo e compatibile con la spettrometria di massa e permette di mettere in evidenza le bande di tutte le proteine presenti.

Fasi della procedura di colorazione:

- Fixing per 15 minuti in una soluzione al 7% di acido acetico e 10% di metanolo;
- Quattro lavaggi da 5 minuti ciascuno con acqua per preparazioni biologiche (p.b.);
- Incubazione per 15 minuti nella soluzione contenente 1% di acido fosforico, 30% di etanolo assoluto e rutenio complessato 20mM;
- Sette lavaggi con acqua p.b. da un minuto ciascuno

L'acquisizione viene eseguita in fluorescenza attraverso il sistema di immagini digitale ImageQuant LAS4010 (GE Healthcare)

3.8.3 Blocking

Nel processo di trasferimento rimangono dei siti liberi sulla membrana che vengono bloccati rivestendo la membrana con una miscela di proteine per evitare il legame non specifico dell'anticorpo su tali siti. In questa fase detta di blocking o saturazione la membrana viene posta in una soluzione chiamata PBS/latte/Tween (latte in polvere povero in grassi al 3%, PBS (10

mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 0.9% NaCl, H₂O a volume) e Tween 20 allo 0.2% per un'ora a temperatura ambiente.

3.8.4 Incubazione con l'anticorpo primario

Avvenuta la saturazione, viene effettuata l'incubazione con l'anticorpo primario che riconosce la proteina specifica di nostro interesse. Poiché tutti i siti della membrana che legano proteine sono bloccati, l'anticorpo aderisce alla membrana solo se si lega con il suo antigene specifico. L'anticorpo primario viene adeguatamente diluito in una determinata quantità di latte e incubato o/n a 4°C.

Gli anticorpi primari utilizzati sono:

- ANXA1 (rabbit) diluizione 1:1000
- CAPZA1 (rabbit) diluizione 1:1000
- CFL1 (rabbit) diluizione 1:1000

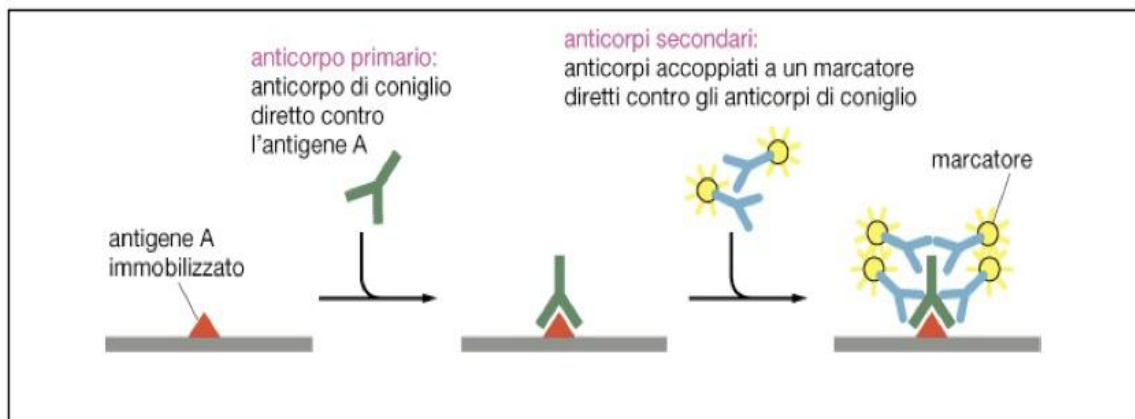
Vengono eseguiti quattro lavaggi con la soluzione di PBS/latte/Tween per eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha aderito al proprio antigene. I lavaggi della membrana vengono eseguiti in agitazione su basculante.

3.8.5 Incubazione con l'anticorpo secondario

La membrana viene incubata per un'ora in una soluzione contenente un anticorpo secondario in grado di reagire con qualunque anticorpo della stessa fonte biologica del primario (fig.8). Gli anticorpi primari utilizzati

sono di rabbit quindi il secondario è anti rabbit diluito 1:10000 in PBS/Milk/Tween.

Per legare e far visualizzare la biotina presente nello standard viene aggiunto l'antibiotina con diluizione 1:5000.



(fig.8. Sistema di riconoscimento con anticorpo primario e secondario)

Tolto l'anticorpo secondario vengono effettuati:

- 4 lavaggi da 10 minuti con PBS/Milk/Tween che permette di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha aderito alle immunoglobuline dell'anticorpo primario;
- 2 lavaggi da 5 minuti con PBS perché il tween 20 può inibire la reazione utilizzata per la rivelazione della proteina;
- 1 lavaggio con H₂O per 1 minuto.

3.8.6 Rivelazione o "detection"

L'ultima fase consiste nella rilevazione delle bande impiegando il metodo della chemiluminescenza (enhanced chemiluminescence, ECL). La membrana di nitrocellulosa viene incubata per un minuto con una

soluzione contenente un agente ossidante e il luminolo che rappresenta il substrato chemiluminescente. L'anticorpo secondario è coniugato ad una perossidasi che catalizza l'ossidazione del luminolo; questa reazione determina l'insorgenza di una fase di eccitazione elettronica seguita dal ritorno allo stato fondamentale con la restituzione dell'energia di eccitazione sotto forma di fotone, quindi ha origine l'emissione luminosa. La quantità di luminescenza sarà proporzionale alla quantità del secondario, quindi alla quantità della proteina che stiamo cercando. L'immagine viene acquisita utilizzando lo strumento "ImageQuant LAS 4000" (GE-Healthcare). L'analisi è stata effettuata con il software "ImageQuant TL".

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

I tumori della parotide sono piuttosto rari e rappresentano meno dell'1% di tutti i tumori umani e circa l'8% dei tumori testa-collo. Presentano un'elevata variabilità istologica e gli istotipi rappresentano entità anche molto diverse fra loro in termini di comportamento biologico e di storia naturale. Gli istotipi predominanti sono l'adenoma pleomorfo, lesione benigna che da sola rappresenta il 60% circa dei MSGT, e il tumore di Warthin, anche esso presenta carattere benigno e corrisponde al 10%, gli istotipi maligni invece corrispondono circa al 15-32% delle localizzazioni. Questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di uno studio che ha applicato per la prima volta i principi dell'analisi proteomica alle neoplasie maligne delle ghiandole salivari maggiori, con il fine di delinearne il profilo proteomico.

La scarsa disponibilità di campioni per l'analisi e l'elevata eterogeneità delle neoplasie parotidiche maligne rendono difficile riuscire a raggiungere una numerosità nel campionamento tale da consentire risultati più robusti dal punto di vista statistico. Una fonte preziosa per lo studio di questa rara forma neoplastica sono gli archivi dei tessuti biotici paraffinati, abbondantemente presenti negli archivi ospedalieri di tutto il mondo. Questa ricchezza di materiale biologico è considerata una risorsa preziosa per la ricerca poiché rende disponibili campioni di tessuto di malattie a bassa incidenza, come sono le neoplasie maligne della parotide, e possono essere impiegati per l'identificazione di nuovi biomarcatori e lo sviluppo e validazione diagnostica degli stessi.

Di conseguenza tale risorsa alternativa può essere impiegata nella fase di validazione dei marcatori proteici, quando è richiesta una grande coorte di campioni. L'analisi proteomica su tessuto estratti proteici da tessuto

paraffinato risulta complicata a causa delle modificazioni chimiche che questa pratica comporta sulle proteine e ciò ha fatto sì che tali tessuti siano stati considerati per lungo tempo inadatti per un'analisi proteomica basata sulla spettrometria di massa. In particolare la fissazione in formalina causa la degradazione proteica e la formazione di proteine crosslinked con dei ponti metilenici intra-catena ed inter-catena molto stabili e ciò compromette notevolmente l'efficienza di estrazione della proteina e l'antigene immunoreattività.

Quindi, l'obiettivo primario di questo lavoro è stato quello di verificare l'adeguatezza e l'efficacia di un protocollo (reference nostra), precedentemente sviluppato dal gruppo di ricerca con cui ho svolto la tesi, per l'estrazione di proteine da tessuti FFPE, e la sua validità in termini di resa qualitativa e quantitativa delle proteine nello specifico degli FFPE parotidei.

In precedenza in questo laboratorio di ricerca è stato effettuato uno studio che ha realizzato un'analisi di tipo comparativo su campioni di agoaspirato di tumori salivari maligni e della più comune forma di tumore salivare benigno, ovvero l'adenoma pleomorfo. Dall'analisi proteomica condotta sono stati identificate proteine i cui livelli di espressione differenziavano i due tipi di tumore.

Il nostro lavoro di tesi si prefigge l'obiettivo di verificare, in un numero ristretto di campioni paraffinati, la situazione osservata nei campioni di agoaspirato riguardante l'espressione differenziale in particolare di tre proteine quali la CFL1, ANXA1 e CAPZA1 risultate significative nel discriminare il tumore parotideo maligno dall'adenoma pleomorfo e/o dal campione sano.

In questo studio sono stati analizzate fettine di tessuto FFPE della ghiandola parotidea di 19 pazienti classificati dopo analisi istologica in 11 neoplasie maligne, 5 adenomi pleomorfi e 3 tessuti sani.

Dopo avere eseguito l'estrazione proteica seguendo il protocollo descritto nel capitolo "Materiali e Metodi", gli estratti proteici sono stati sottoposti all'SDS-PAGE e ad analisi Western Blot utilizzando anticorpi policlonali specifici per le proteine ricercate.

Per ogni proteina testata è stata determinata la densità ottica della banda immunoreattiva specifica, e dopo normalizzazione sulle proteine totali sono stati comparati i valori medi \pm errore standard di misura (SEM) ottenuti per le diverse neoplasie e il controllo. La significatività della differenza di espressione delle diverse proteine nei tumori maligni rispetto all'adenoma pleomorfo e ai tessuti sani è stata valutata tramite il Mann-Whitney test.

In Fig. 9 è riportato il grafico a barre relativo all'espressione di ANXA1 nei campioni esaminati. La differenza di espressione presenta un valore di p vicino alla significatività. Si conferma un incremento di espressione di circa 4,2 e 4,9 volte dell'annexina 1 nell'adenoma pleomorfo rispetto al tessuto maligno e sano rispettivamente, in linea con i dati ottenuti dall'analisi bidimensionale condotta su campioni di ago aspirato parotideo.

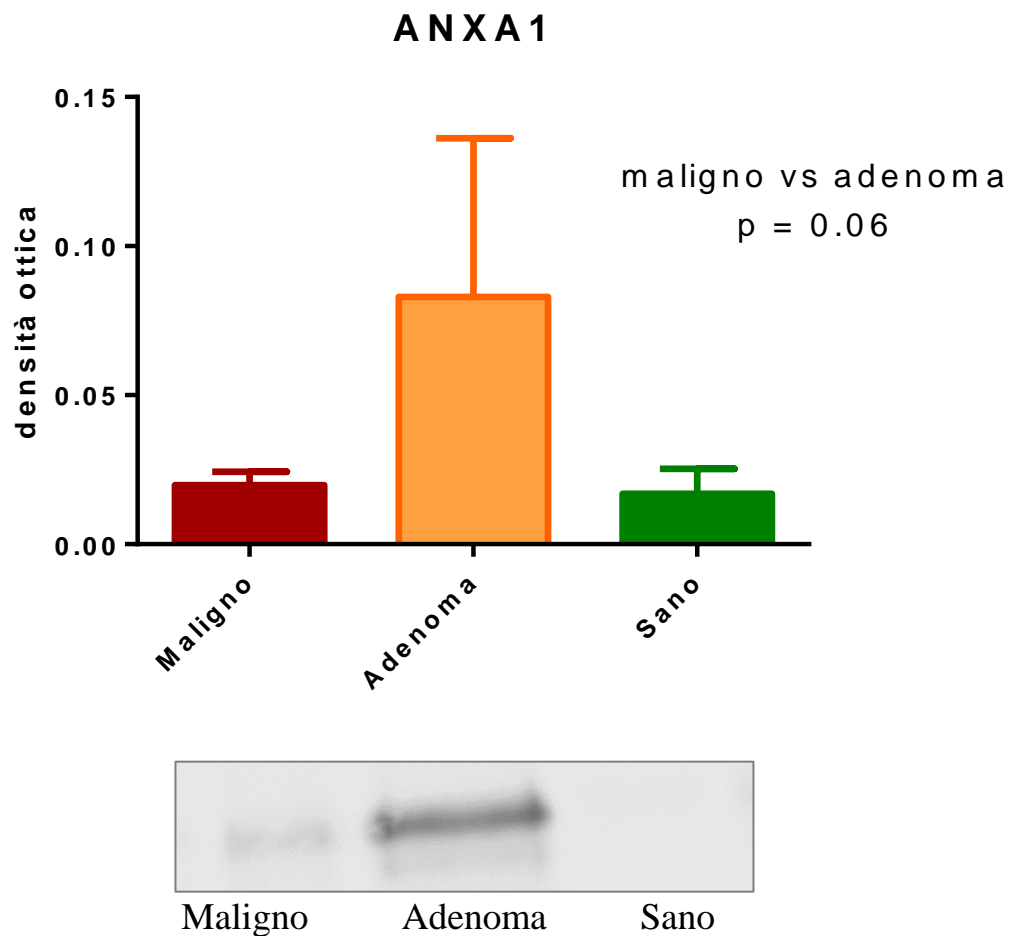


Figure 9: Validazione di ANXA1 sui paraffinati tramite WB. Il grafico a barre mostra la media \pm SEM dei valori OD.

In figura 10 sono riportati i risultati ottenuti per CFL1 che è risultata maggiormente espressa nei campioni maligni rispetto ai sani con una differenza di espressione significativa (p value = 0.03^*) di circa 5.1 volte. Anche questi risultati confermano quelli ottenuti dall'analisi 2DE.

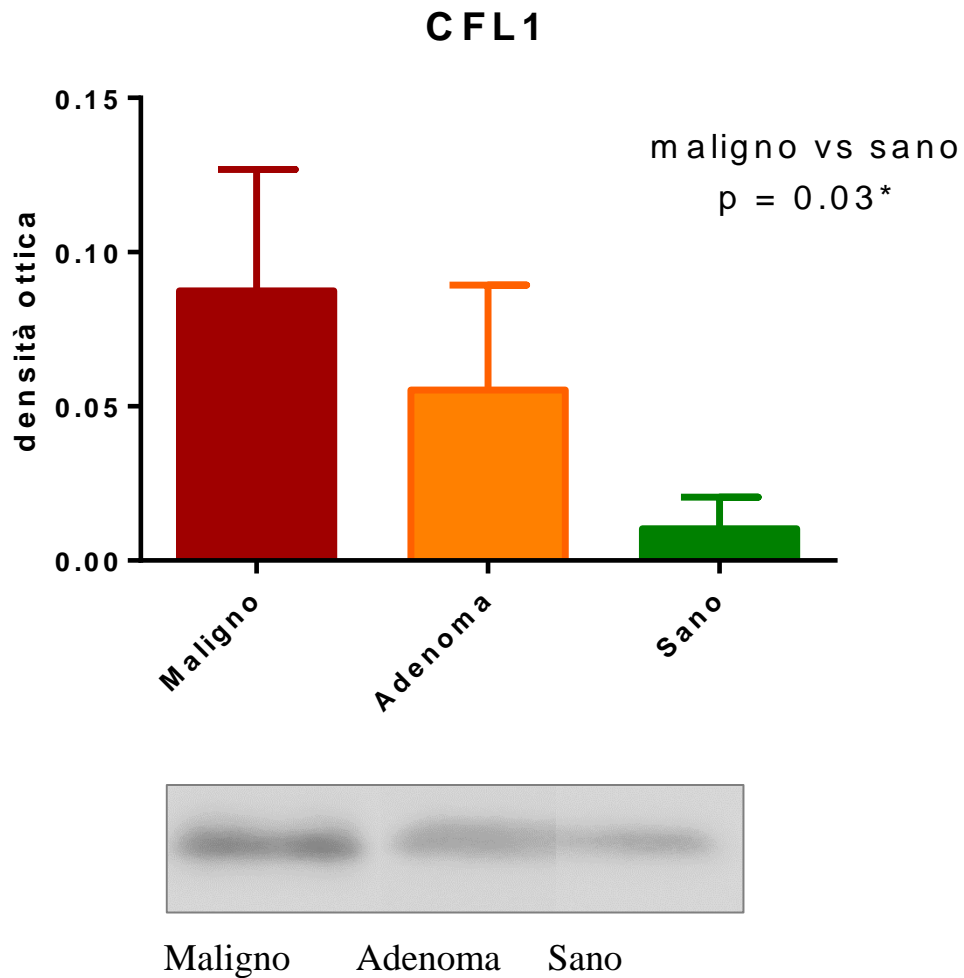


Figure 10: Validazione di *CFL1* sui paraffinati tramite WB. Il grafico a barre mostra la media \pm SEM dei valori OD.

Infine in Figura 11 sono riportati i risultati ottenuti per la proteina CAPZA1 che risulta maggiormente espressa nell'istotipo maligno rispetto al sano con valori di incremento di 8.4 volte e di significatività non lontani dalla soglia (p value = 0.08).

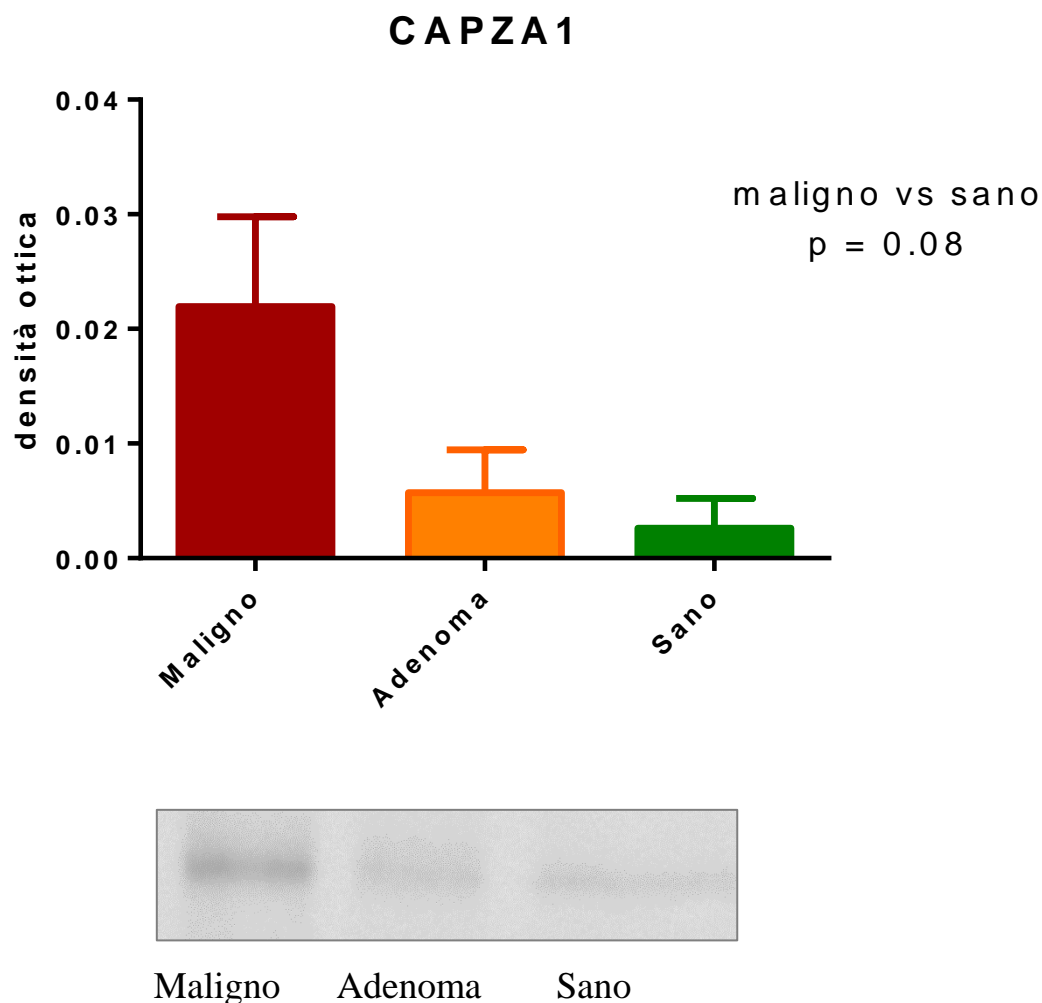


Figure 11: Validazione di CAPZA1 sui paraffinati tramite WB. Il grafico a barre mostra la media \pm SEM dei valori OD.

Da un punto di vista strutturale e funzionale Annessina A1 (ANXA1, lipocortina 1) è il primo membro caratterizzato della superfamiglia delle annessine, proteine così chiamate per la loro proprietà di legare (to annex) le membrane cellulari in maniera Ca^{2+} -dipendente. ANXA1 è coinvolta in una vasta gamma di processi molecolari e cellulari, come le vie di segnale

anti-infiammatorie, le attività chinasiche nelle vie di trasduzione del segnale, il mantenimento dell'integrità del citoscheletro e della matrice extracellulare, la proliferazione cellulare, l'apoptosi e il differenziamento.

Esistono evidenze che l'alterata regolazione di ANXA1 è associata a oncogenesi, invasione, metastasi e farmaco resistenza candidandosi quale potenziale biomarcatore per la diagnosi, il trattamento e la prognosi di alcuni tumori (19).

Le prove di ricerca negli ultimi anni indicano che Anxa1 potrebbe specificamente funzionare sia come soppressore che come un promotore tumorale a seconda del particolare tipo di cellule tumorali / tessuti (19).

Tale proteina è stata dimostrata iperespressa nel carcinoma mammario (21) e nel carcinoma epatocellulare (52), mentre risulta fortemente down-regolata nel carcinoma esofageo e nel carcinoma testa-collo. Per quanto riguarda il distretto testa-collo, è stato recentemente dimostrato che la soppressione di ANXA1 sembra associata ad una maggiore proliferazione cellulare, migrazione ed invasione, e sembra inoltre indurre una transizione epiteliale-mesenchimale (20). Questo sembra concordare con i risultati studio ottenuti nel nostro laboratorio in cui ANXA1 risulta ipo-espressa nel tessuto salivare maligno rispetto a quanto non accada per l'adenoma pleomorfo.

ANXA1 è stata inizialmente ampiamente studiata per il suo ruolo nel processo infiammatorio (51), ma la sua sovraespressione è stata successivamente riportata in un gran numero di tumori. Ulteriori approfondite indagini hanno rivelato che questa proteina potrebbe avere molti ruoli nella progressione del cancro e di agire a diversi livelli (sia nell'insorgenza della neoplasia che nelle metastasi). Questo è in parte dovuto alla posizione di ANXA1 in differenti compartimenti cellulari. ANXA1 può essere nucleare, citoplasmatica e / o associata alla membrana.

In alcuni tipi di cancro, ANXA1 si trova sulla superficie cellulare, dove stimola i recettori formil-peptidi per attivare processi oncogenici.

La F-actin capping protein è un eterodimero composto da due subunità, alpha e beta, e si legano in maniera Ca^{2+} -indipendente all'estremità dei filamenti di actina a rapida crescita (fine spinato), bloccando così lo scambio di subunità in queste estremità. A differenza di altre proteine, queste proteine dette “proteine di fissaggio” non recidono i filamenti di actina ma ne regolano la crescita e controllano la stabilità dei microfilamenti. Il sistema actina filamento è una parte importante del citoscheletro nelle cellule eucariotiche, è sia una struttura statica che una rete dinamica che può subire riarrangiamenti. Si pensa sia coinvolta in processi come il movimento cellulare e la fagocitosi, così come la contrazione muscolare (53).

Nello studio bidimensionale condotto in precedenza è stato evidenziato un incremento significativo dell'espressione di entrambe le subunità, alpha 1 (CAPZA1) e beta (CAPZB) nei tumori salivari maligni rispetto all'adenoma pleomorfo e al controllo sano. Nel tessuto paraffinato viene confermato questo andamento anche se i valori di p value sono al limite della significatività. Il ruolo di questa proteina è stato indagato in diversi tumori. Nel tumore gastrico ad esempio un'iperespressione di CAPZA1 è stata correlata con la presenza di un'istologia ben differenziata, tumore di piccole dimensioni, stadio T ridotto, assenza di metastasi linfonodali, minor tasso di recidiva e sopravvivenza superiore rispetto alla sua ipoespressione nel cancro gastrico, facendo ipotizzare un suo ruolo protettivo (23). Tale studio ha fatto ipotizzare che CAPZA1 potrebbe essere un indicatore di buona prognosi nel cancro gastrico e dimostra che CAPZA1 è associata ad una diminuzione della migrazione delle cellule tumorali.

Cofilina 1 (CFL1) è una piccola proteina capace di legarsi all'actina che è stata dimostrata iperespressa in differenti tipi di tumore (54-56), tra cui i

carcinomi del cavo orale (57-59). Questa proteina, le sue isoforme e i suoi regolatori giocano un ruolo fondamentale nel rimodellamento dei filamenti di actina e risultano direttamente correlate nella chemiotassi, nella migrazione cellulare e nella metastatizzazione (22). Ad esempio, è stato dimostrato che l'iperespressione di cofilina 1 aumenta la motilità delle cellule del glioblastoma in maniera concentrazione dipendente, contribuendo alla sua invasività (60).

Nel loro insieme i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi suggeriscono la potenzialità di usare estratti proteici da tessuti paraffinati nella validazione di potenziali biomarcatori del tumore maligno parotideo. La validità del metodo di estrazione delle proteine dal tessuto paraffinato è confermata dalla riproducibilità dei risultati ottenuti dall'analisi western blot effettuata sugli estratti proteici che ricalca i risultati ottenuti dall'analisi 2DE e western blot condotta in precedenza su campioni di ago aspirato parotideo. L'utilizzo delle banche di campioni FFPE consentirà una validazione più rapida in termini di tempo, data la disponibilità di campioni di patologie a bassa incidenza, e più significativa dal punto di vista statistico dei potenziali biomarcatori.

Bibliografia

1. Castelnovo P, Latorre P, Dionigi R. Ghiandole salivari. Chirurgia (2011); 2:1488-1490.
2. Spriano G. I tumori delle ghiandole salivari maggiori. Relazione Ufficiale del XCV Congresso Nazionale SIO, 2008.
3. Gregoire C. Salivary gland tumors: The parotid gland. In: Bagheri SC, Bell RB, Ali Khan H (Eds). Current therapy in oral and maxillofacial surgery. Elsevier: St. Louis 2012, pp. 450-460.
4. Modan B, Chetrit A. Increased risk of salivary gland tumors after low-dose irradiation. Laryngoscope 1998; 108: 1095-1097.
5. Levis AG, Minicuci N, Ricci P, Gennaro V, Garbisa S. Mobile phones and head tumours. The discrepancies in cause-effect relationships in the epidemiological studies - how do they arise? Environ Health 2011; 10:59.
6. Söderqvist F, Carlberg M, Hardell L. Use of wireless phones and the risk of salivary gland tumours: a case-control study. Eur J Cancer Prev 2012; 21:576-579.
7. Hardell L, Carlberg M, Hansson Mild K. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. Pathophysiology 2009; 16:113-122.
8. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.
9. Ellis GL, Auclair PL, (Eds). Tumours of the salivary glands, 3rd ed. Armed Forces Institute of Pathology: Washington 1996.
10. Gnepp DR. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. Pathol Annu 1993; 28 Pt1: 279-328.

11. Licitra L, Grandi C, Molinari R. Major and minor salivary glands tumours. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 43:215-225.
12. Mukunyadzi P. Review of Fine-Needle Aspiration cytology of salivary gland neoplasms, with emphasis on differential diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2002; 118:100-115.
13. Wang SJ, Eisele DW. Parotidectomy. Anatomical considerations. *Clin Anat* 2012; 25:12–18.
14. Terhaard CHJ, Lubsen H. The role of radiotherapy in the treatment of malignant salivary glands. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 2005; 61:103-111.
15. Barbosa EB, Vidotto A, Musi Polachini G, Henrique T, Marqui AB, Tajara EH. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58:366-375.
16. Toss A, De Matteis E, Rossi E, et al. Ovarian Cancer: Can proteomics give new insights for therapy and diagnosis? *Int J Mol Sci* 2013; 14:8271-8290.
17. Giusti L, Iacconi P, Ciregia F, et al. Fine-Needle Aspiration of Thyroid Nodules: Proteomic Analysis To Identify Cancer Biomarkers. *J Proteome Res* 2008; 7:4079–4088.
18. Donadio E, Giusti L, Seccia V, et al. New insight into benign tumours of major salivary glands by proteomic approach. *PLoS One* 2013; 8:e71874
19. Guo C, Liu S, Sun MZ. Potential role of Anxa1 in cancer. *Future Oncol* 2013; 9:1773-93.
20. Suh YE, Raulf N, Gäken J, et al. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance. *Int J Cancer* 2014; doi: 10.1002/ijc.29397. [Epub ahead of print]

21. Ahn SH, Sawada H, Ro JY, Nicolson GL. Differential expression of annexin I in human mammary ductal epithelial cells in normal and benign and malignant breast tissues. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15:151–156.
22. Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:429-440.
23. Lee YJ, Jeong SH, Hong SC, et al. Prognostic value of CAPZA1 overexpression in gastric cancer. *Int J Oncol* 2013; 42:1569-1577.
24. AIRT Working group. I tumori in Italia- Rapporto 2006. Incidenza, mortalità e stime. www.registri-tumori.it.
25. Armstrong JG, Harrison LB, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Fass DE, Zelefsky MJ, et al. The indications for elective treatment of the neck in cancer of the major salivary glands. *Cancer* 1992; 69: 615-619
26. Christiansen MS, Mourad WA, Hales ML, Oldring DJ. Spindle cell malignant lymphoepithelial lesion of the parotid gland: clinical light microscopic, ultrastructural, and in situ hybridization findings in one case. *Modern Pathology* 1995;8:711-5.
27. D.Casolino, D.Padovani, D. Salsi, F.Soprani. Relazione Ufficiale: I tumori delle ghiandole salivari maggiori, di Giuseppe Spriano. XCV Congresso Nazionale, *Torino*, 2008.
28. Choudhary J, Grant SGN. “Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning”. *Nature Neuroscience* 2004; 5 (7): 440-445.
29. Horn-Loss PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology* 1997; 8:419-9.
30. Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. *Hum Pathol* 2001; 32: 596-604
31. Muscat JE, Wynder EL. A case/control study of risk factors for major salivary gland cancer. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1998; 118

32. Rinaldo A, Shaha AR, Pellitteri PK, Bradkey PJ, Ferlito A. Management of malignant sublingual salivary gland tumors. *Oral Oncol* 2004; 40:2-5.
33. Swanson GM, Burns PB. Cancer incidence among women in the workplace: a study of the association between occupation and industry and 11 cancer sites. *J Occup Environ Med* 1995; 37:282-7.
34. C. Casella, Principi di fisiologia tratti dalle lezioni del Prof. Cesare Casella Volume primo. 1980,
35. Pasqualino A, Panattoni GL. Anatomia Umana, Citologia, Istologia, Embriologia, Anatomia sistemica, capitolo 26 pag 536
36. Anatomia Patologica, di Giorgio Salvadè, Kristalitalia Medici della carità, MEG Edizioni, Bergamo –Tirana- 2011
37. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2006; 88:39–325.
38. A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations. International Agency For Research On Cancer (IARC) Monographs. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2012; 100F.
39. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, *et al.* Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014; 67(11):923-931.
40. College of American Pathologist, Laboratory Accreditation Manual 2013 Edition.
41. Metz B, kersten GF, Hoogerhout P et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J.Biol.Chem.* 279(8), 6235-6243 (2004)
42. Conti CJ, Larcher F, Chesner J, Aldaz CM. Polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting of proteins from paraffin-embedded tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1988; 36:547-550.

43. Sompuram SR, Vani K, Messana E, Bogen SA. A Molecular Mechanism of Formalin Fixation and Antigen Retrieval. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004; 121:190-199.
44. Jiang X, Jiang X, Feng S, Tian R, *et al.*. Development of efficient protein extraction methods for shotgun proteome analysis of formalin-fixed tissues. *J. Prot. Res.* 2007; 6:1038-1047. 78 Hwang SI, Thumar
45. Hwang SI, Thumar J, Lundgren DH, Rezaul K, *et al.*. Direct cancer tissue proteomics: a method to identify candidate cancer biomarkers from formalin-fixed paraffin-embedded archival tissues. *Oncogene* 2007; 26:65-76.
46. Crockett DK, Lin Z, Vaughn CP, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Identification of proteins from formalin-fixed, paraffin embedded cells by LC-MS/MS. *Lab. Invest.* 2005; 85:1405-1415.
47. Donadio E, Giusti L, Cetani F *et al.* Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue in the proteomic analysis of parathyroid glands. *Proteome Sci.* 9(1), 29 (2011)
48. Rodriguez- Rigüero T, Valladares- Ayerbes M, Haz-Conde M *et al.* A novel procedure for protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Proteomics* 11(12), 2555-2559 (2011)
49. Giusti L. and Lucacchini A. Proteomic studies of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Expert Rev. Proteomics* 10(2), 165-177 (2013)
50. Mansour A, Chatila R *et al.* A novel xylene free deparaffinization method for extraction of proteins from human derived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) archival tissue blocks. *MethodsX* 1 (2014) 90-95
51. Kang H, Ko J, Jang SW. The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423: 188–194.

52. Masaki T, Tokuda M, Ohnishi M, et al. Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24:72–81.
53. Maruyama K, Kurokawa H, Oosawa M, et al. Beta-actinin is equivalent to Cap Z protein. *J Biol Chem* 1990; 265:8712-8715.
54. Peng XC, Gong FM, Zhao YW, et al. Comparative proteomic approach identifies PKM2 and cofilin-1 as potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets for pulmonary adenocarcinoma. *PLoS One* 2011; 6:e27309
55. Zhang Y, Tong X. Expression of the actin-binding proteins indicates that cofilin and fascin are related to breast tumour size. *J Int Med Res* 2010; 38:1042-1048.
56. Lu LI, Fu NI, Luo XU, Li XY, Li XP. Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications. *Oncol Lett* 2015; 9:2757-2761.
57. Kohen J, Krapfenbauer K, Huber S, et al. Potential involvement of MYC- and p53-related pathways in tumorigenesis in human oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *J Proteome Res* 2008; 7:3818-3829.
58. Wang Z, Feng X, Liu X, et al. Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *BMC Genomics* 2009; 10:383.
59. Turhani D, Krapfenbauer K, Thurnher D, Langen H, Fountoulakis M. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *Electrophoresis* 2006; 27:1417-1423.

60. Yap CT, Simpson TI, Pratt T, Price DJ, Maciver SK. The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. *Cell Motil Cytoskeleton* 2005; 60:153-165.